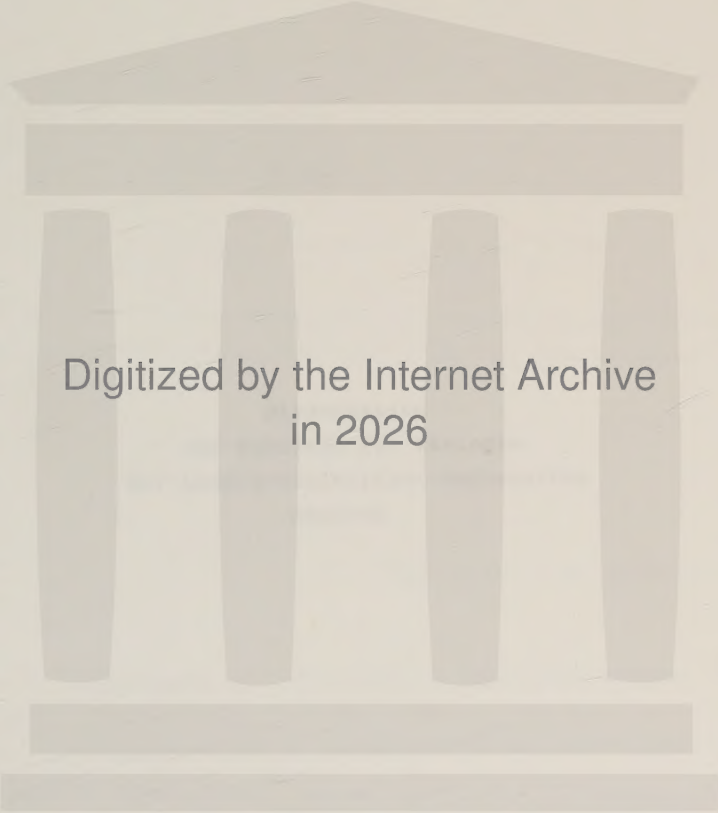


Menschliche Immunglobulingene vom K - Typ:
Analyse der L - Regionen durch Cosmidklonierung und
Sequenzierung

Erwin Huber
München 1989





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Menschliche Immunglobulingene vom K-Typ:
Analyse der L-Regionen durch Cosmidklonierung und
Sequenzierung

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Erwin Huber
aus Stuttgart
München 1989

vorgelegt am 2. März 1989

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Schmieger
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. F. Fiedler

Sondergutachter : Professor Dr. H. G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 29.5.1989

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Mai 1984 bis Mai 1988 durchgeführt.

Herrn Prof. H.G. Zachau danke ich für seine Unterstützung und Betreuung. Allen Kollegen gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit und Diskussionen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

Straubinger, B., Huber, E., Lorenz, W., Osterholzer, E., Pargent, W., Pech, M., Pohlenz, H.-D., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1988) J. Mol. Biol. 199, 23-34

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Problemstellung.....	1
2.	Ergebnisse.....	5
2.1.	Struktur der duplizierten L-Regionen La und Lb.....	5
2.1.1.	Cosmidklone aus den Kernbereichen der L-Regionen.....	11
2.1.2.	Versuche zur Extension der 5'-Seite der L-Regionen.....	13
2.1.3.	Versuche zur Extension der 3'-Seite der L-Regionen.....	14
2.1.4.	Im 5'-terminalen Bereich der Duplikation sind die beiden Kopien möglicherweise sehr ähnlich.....	16
2.1.5.	Homologieabbruch im 3'-terminalen Bereich der L-Regionen.....	19
2.1.6.	V _K -Gene der L-Regionen.....	25
2.2.	Beiträge zur Struktur benachbarter Regionen der L-Regionen.....	31
2.2.1.	Lokalisierungsuntersuchungen mit Hilfe der V _K I-Genen benachbarten L-Sequenzen.....	31
2.2.2.	Zuordnungsversuche von L-Sequenzen tragenden Phagenklonen.....	34

2.2.3.	Sequenzanalysen zweier Gene der A-Regionen.....	38
3.	Diskussion.....	42
3.1.	Strukturanalyse des menschlichen V_K -Locus.....	42
3.2.	Vorkommen verschiedener Genombereiche in Cosmidbanken.....	43
3.3.	Mögliche Mechanismen bei der Entstehung des Homologieabbruchs der L-Regionen.....	45
3.4.	Gesamtstruktur des V_K -Locus.....	49
3.5.	Implikationen der Strukturdaten für die Evolution von Multigenfamilien.....	50
4.	Materialien und Methoden.....	51
4.1.	Chemikalien und Enzyme.....	51
4.2.	Bakterienstämme, Vektoren und DNAs.....	52
4.3.	Cosmidgenbanken und Hybridisierungsproben.....	52
4.4.	Restriktionskartierung.....	53
4.5.	Gelelektrophorese und Isolierung von DNA- Fragmenten aus Gelen.....	53
4.6.	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmid- und M13 Phagen- Vektoren.....	54
4.7.	DNA-Sequenzierung.....	55

4.8.	Radioaktive Markierung von DNA.....	56
4.9.	DNA-Transfer und Hybridisierungen.....	56
4.10.	Präparation von Anreicherungsfiltern.....	57
4.11.	Präparation von DNA.....	57
4.11.1.	Isolierung von Cosmid- und Plasmid-DNA.....	57
4.11.2.	Isolierung von DNA aus M13 Phagenklonen.....	58
4.12.	Biologische Sicherheit.....	58
5.	Zusammenfassung.....	62
6.	Literaturverzeichnis.....	65
7.	Abkürzungsverzeichnis Lebenslauf.....	71

1. Einleitung und Problemstellung

Bei Wirbeltieren entwickelte sich im Verlaufe der Evolution das Immunsystem. Aufgrund seiner Fähigkeit, "Selbst" von "Nicht-Selbst" zu unterscheiden, ist es in der Lage, gezielt gegen körperfremde Stoffe oder Organismen vorzugehen und diese unschädlich zu machen (1). Außerdem hat es die wichtige Aufgabe, körpereigene Zellen, die aufgrund verschiedener Ursachen beginnen, sich unkontrolliert zu vermehren, zu erkennen und zu töten. Ein Teil der Antwort des Immunsystems auf Antigene besteht darin, hochspezifische Proteine (Antikörper) zu bilden, welche die Antigene nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip erkennen und diese binden. Die Synthese der Antikörper findet in den sogenannten Plasmazellen, Abkömmlingen von B-Zellen statt, welche die Antikörper in großen Mengen sezernieren. Die Aufgabe dieser Zellen ist es also, mittels der Antikörper Antigene zu erkennen und zu binden. Das so markierte Antigen wird dann durch andere Zellen der Immunsystems erkannt und zerstört. Zu diesen Zellen gehören Makrophagen sowie spezielle T-Zellen. T-Zellen werden wie B-Zellen im Knochenmark gebildet. Im Gegensatz zu diesen erreichen sie den ausgereiften Zustand erst nach der Passage eines speziellen Organs, des Thymus. Nur Zellen, die gelernt haben, zwischen "Selbst" und "Nicht-Selbst" zu unterscheiden, verlassen den Thymus (2,3). T-Zellen sind für zellvermittelte Antwort des Immunsystems verantwortlich. Sie erkennen Antigene nur im Kontext mit MHC-Molekülen (4,5). Dies sind körpereigene Proteine, die auf der Zelloberfläche jeder Zelle vorhanden sind. T-Zellen haben eine wichtige Aufgabe bei der Steuerung des Immunsystems. Sie können durch die Ausscheidung von Interleukinen (6,7,8) B-Zellen, die ein Antigen erkennen, zur weiteren Differenzierung und Produktion von Antikörpern anregen. Dies geschieht durch eine spezielle Subpopulation von T-Zellen, die T-Helferzellen (9).



Sie steigern auch die Aktivität einer weiteren Subpopulation, der cytotoxischen T-Zellen (10). Diese sind darauf spezialisiert, fremde Zellen sowie virusbefallene körpereigene Zellen abzutöten.

Eine weitere Klasse von T-Zellen, die Suppressor-T-Zellen (11), sorgen dafür, daß nach Eliminierung eines Antigens die Immunantwort gegen dieses wieder gedrosselt wird. Sie hemmen die Proliferation der cytotoxischen T-Zellen sowie der B-Zellen, die dieses Antigen erkennen.

Eine wesentliche Eigenschaft des Immunsystems ist seine Fähigkeit, nach einer primären Antwort auf ein bestimmtes Antigen dieses bei darauffolgenden Kontakten "wiederzuerkennen". Spezielle B-Zellen, sogenannte "Gedächtniszellen", dienen bei einer primären Infektion nicht der Bildung von Antikörpern, sondern kreisen nach Beendigung der Immunantwort weiter im Blut. Bei einer erneuten Infektion mit demgleichen Antigen sorgen sie dafür, daß nun die Immunreaktionen wesentlich schneller und stärker erfolgen und es daher nicht zu einem Ausbruch der Krankheit kommt.

Ein Antikörpermolekül besteht aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Proteinketten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (12,13). Die amino-terminalen Teile dieser Ketten sind variabel, (V-Region), die des carboxy-terminalen Bereichs (C-Region) sind konstant (14). Die V-Region enthält Bereiche, die besonders große Sequenzvariabilität aufweisen (hypervariable Bereiche). Verantwortlich für die Spezifität der Antikörper ist die V-Region, wobei die hypervariablen Bereiche die Kontaktstelle mit dem Antigen darstellen. Da die Antikörper Antigene nach dem oben genannten Modus erkennen, muß die Zahl der möglichen Antikörper mit der Zahl der Antigene korrelieren (15,16). Diese übersteigt jedoch bei weitem die Kodierungskapazität des Genoms, wenn man von der "Ein Gen-ein Protein"-Hypothese ausgeht. Deshalb wurde schon sehr früh postuliert (17), daß die Information für die Bildung eines Antikörpers durch Kombination verschiedener, voneinander

getrennter Gensegmente entsteht. Im Falle der leichten Ketten wird ein V-Gensegment mit einem J-Gensegment verknüpft (18-20). Die Zahl der V-Gensegmente beträgt beim Menschen 80 Gene (21-25), die tatsächliche Zahl dürfte etwas, aber nicht wesentlich höher liegen. Die Zahl der J-Gensegmente beim Menschen beträgt fünf. Zusätzliche Variabilitätsmöglichkeiten sind durch den Mechanismus der V-J Verknüpfung gegeben, der die Verknüpfung nicht auf ein bestimmtes Nukleotid festlegt, sondern verschiedene Verknüpfungsstellen toleriert (26, 27). Weitere Faktoren sind die verschiedenen Kombinationen von leichten und schweren Ketten sowie die somatischen Mutationen, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Vielfalt der Antikörper spielen. Diese Punktmutationen treten nur in den variablen Regionen nach dem Übergang in die umgelagerte Konfiguration auf (28,29).

Die Immunglobuline sind in verschiedene Klassen eingeteilt, die mit den verschiedenen Aufgaben bei der Immunabwehr korrelieren. Kennzeichnend für die verschiedenen Klassen ist der konstante Teil der schweren Ketten (C_H). Zunächst produziert eine differenzierte B-Zelle immer IgM. Durch weitere Umlagerungsvorgänge kann dieses C-Segment dann durch andere ersetzt werden (30). Im Humanserum sind 70% der leichten Ketten der Immunglobuline vom K-Typus (31). Eine kleine Zahl von Subgruppen (I-IV, Ref. 31,32,33,) sowie eine überschaubare Zahl von V_K -Gensegmenten sind für den V_K -Locus charakteristisch. Die V_K -Loci anderer Organismen, wie der Maus, sind wesentlich umfangreicher. Bei der Maus sind die mehreren hundert V_K -Gene in mehr als 20 Subgruppen unterteilt (34,35). Der V_K -Locus des Menschen stellt hinsichtlich seines hohen Anteils bei der Bildung der leichten Ketten der Immunglobuline sowie seiner Größe ein geeignetes Untersuchungsobjekt für die Klärung verschiedener nicht gelöster Fragestellungen dar. Diese betreffen die exakte Zahl der V-Gene und somit auch den Anteil des Keimbahnpotentials am Antikörperrepertoire. Gleichzeitig kann damit die Bedeutung der somatischen Mutationen besser als bisher einge-

schätzt werden. Während andere Gensegmente, wie J- und C-Elemente hinsichtlich Struktur und Anzahl genau charakterisiert sind, liegen bis auf die V_{λ} -Gene der Maus (36) keinerlei endgültigen Aussagen über die Struktur und Größe der V_K -Multigenfamilie vor.

Ein Ziel der Arbeitsgruppe ist die Strukturaufklärung des V_K -Locus des Menschen. Hierzu soll die Multigenfamilie durch überlappende Phagen- und Cosmidklone charakterisiert werden. Am Anfang der vorliegenden Arbeit waren große, zusammenhängende Bereiche des V_K -Locus in Form von Cosmidklonen etabliert. Die Bereiche werden inzwischen als W, A, O und L-Regionen bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt war bereits bekannt, daß zumindest zwei dieser zusammenhängenden Bereiche, die heutigen L-Regionen, in duplizierter Form im Genom vorliegen (23). Im Verlauf der weiteren Strukturaufklärung stellte sich heraus, daß nahezu der gesamte V_K -Locus auf Chromosom 2 dupliziert ist (37). Die beiden Kopien liegen auf zwei verschiedenen NotI-Fragmenten. Gene innerhalb einer der duplizierten Kopien besitzen die gleiche Orientierung. Jedoch sind die beiden Kopien wahrscheinlich invers angeordnet. Ein überraschender Befund war die Entdeckung, daß auch außerhalb des V_K -Locus auf verschiedenen Chromosomen V_K -Gensegmente vorkommen (38).

Die in der vorliegenden Arbeit bearbeiteten L-Regionen liegen auf der 3'-Seite der A-Regionen. Sie sollten durch überlappende Cosmide extendiert werden und an die A-Regionen angegliedert werden. Neu isolierte Gensegmente sollten durch Hybridisierungen und Sequenzierungen charakterisiert und in ihrer Polarität, die für die verschiedenen Umlagerungsmechanismen interessant ist, festgelegt werden. Außerdem sollten einzelne, bereits vorhandene Phagenklone den klonierten Bereichen angegliedert werden.

2. Ergebnisse

2.1. Struktur der duplizierten L-Regionen La und Lb

Im Verlauf der Strukturaufklärung des menschlichen V_K -Locus in der Arbeitsgruppe von Professor Zachau wurden mehrere Regionen auf Chromosom 2 charakterisiert und analysiert, die als gemeinsames Strukturmerkmal eine Duplikation aufweisen. Dies konnte zum ersten Mal von Pech et al. (23) für die in dieser Arbeit weiter untersuchten Regionen La und Lb gezeigt werden (Abb.1). Namensgebend für die L-Regionen war eine niedrig repetitive Sequenzfamilie, die sogenannten L-Sequenzen (23,39). Gefunden wurden diese sowohl in der Nachbarschaft von V_K I-Genen als auch isoliert ohne V_K -Gene. Das etwa 500bp lange Sequenzmotiv liegt im ersteren Fall etwa 700 bp entfernt vom Ende des jeweiligen V_K -Gens auf dessen 3'-Seite. Die Sequenzfamilie umfaßt schätzungsweise 100 Mitglieder.

Man nimmt an, daß die heutige Struktur der L-Regionen durch Duplikation aus einer Vorläuferregion hervorging. Die Polarität der V_K -Gene innerhalb der duplizierten Regionen ist gleich, jedoch sind die beiden Kopien wahrscheinlich invers angeordnet (37). Die V_K -Gene der L-Regionen gehören hauptsächlich der Subgruppe I an. Es gibt jedoch auch Gene der Subgruppen II und III, die vermutlich durch Transpositionseignisse in die ursprünglich nur aus V_K I-Genen bestehenden L-Regionen eingebracht wurden (40). Der Abstand zwischen den Genen beträgt etwa zehn kb. Vereinzelt gibt es auch wesentliche größere Abstände (z.B. L10 und L11: 30 kb). Insgesamt umfassen die beiden L-Regionen 200 kb, sie enthalten 16 V_K -Gene der Subgruppen I, II und III. Abb. 2 und 3 zeigen die La- und Lb-Regionen mit repräsentativen Cosmiden. Auffällig ist die ausgeprägte Flankenhomologie der V_K -Gene innerhalb der L-Regionen. Dies wird bei einigen Genen (Subgruppe III) schon beim Vergleich der Restriktionsschnitt-

Abb.1: Kernbereich der L-Regionen

Gezeigt sind die Kernbereiche der La- und Lb-Regionen, repräsentiert durch die Cosmide cos 21, cos 103, cos 105, cos 106. Diese Cosmide waren der Ausgangspunkt für weitere Isolierungen und Charakterisierungen von extendierenden Cosmiden der vorliegenden Arbeit.

Die V_K-Genbereiche sind durch ausgefüllte Kästchen angegeben, wobei der Signalpeptidanteil gesondert eingezeichnet ist.

Die Subgruppenklassifizierung der jeweiligen Gene ist durch römische Ziffern angegeben. Die Erklärungen für die verwendeten Nucleaseabkürzungen sind in der allgemeinen Abkürzungstabelle zu finden. Der Nullpunkt des Maßstabs wurde bei Abbildungen der L-Regionen auf das 5'-Ende der Lb-Region gelegt (vgl. Abb.3). Dementsprechend beginnen die Maßstäbe einiger Abbildungen mit Werten über Null.

stellen in der Umgebung der Gene deutlich. So liegen die Subgruppe-III-Gene bis auf eine Ausnahme (L13) auf BglII-Fragmenten gleicher Größe. Zusätzlich sind KpnI- und SmaI-Spaltstellen in der Nähe dieser Gene ein typisches Merkmal. Charakteristisch für alle Gene der L-Regionen ist, daß Suchklone aus den weiten 3'- und 5'-Flanken eines Gens in den meisten Fällen auch die entsprechenden Flanken der anderen Gene der gleichen Subgruppe erkennen. Dies ist für die Subgruppen I, II und III zutreffend (vgl. 2.1.3.).

Vermutlich sind die Flankenhomologien eng mit der Entstehungsgeschichte der L-Regionen verknüpft. Von den sechzehn Genen der L-Regionen sind die meisten funktionelle Gene; es gibt jedoch auch Pseudogene. So ist bei dem Genpaar L1 und L11 die Heptanukleotidsequenz, die eine Signalsequenz für den Umlagerungsmechanismus darstellt, gegenüber der Consensussequenz verändert (23). Dies hat wahrscheinlich zur Folge, daß keine Umlagerungen mehr möglich sind und dieses Genpaar nicht zum Keimbahnreertoire beiträgt. Das Gen L1 trägt zusätzlich noch eine weitere Mutation. Das Codon 35 ist hier zum Stopcodon degeneriert (23). Ein weiteres Pseudogen ist das Gen L6. Hier ist ein Bereich aus der 5'-Flanke, in der normalerweise wichtige Sequenzen zur Regulation der Transkription liegen, stark verändert (vgl.

2.1.6.) Bei dem Genpaar L4 und L14 haben multiple Mutationen dazu geführt, daß es sich auch bei diesen Genen um Pseudogene handelt (22).

Von den bis jetzt isolierten sechzehn Genen der L-Regionen sind also fünf Pseudogene.

Tabelle 1: Die bisher den L-Regionen zugeordneten und charakterisierten Cosmide

Cosmide	Lage innerhalb der L-Regionen	isoliert	charakterisiert	Zitate
502	La 35,5-72,8	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
205	La 38,1-77,6	H.D.P.	E.H.	vorl.Arbeit
655	La 38,1-72,0	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
507	La 38,9-79,4	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
660	La 39,3-79,4	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
506	La 44,7-78,8	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
21	La 46,1-81,6	M.P.	M.P.	(22)
658	La 49,1-80,8	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
132	La 67,6-113,8	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
100	La 69,5-107,4	H.D.P.	M.P.	vorl.Arbeit
204	La 72,3-117,4	H.D.P.	E.H.	vorl.Arbeit
101	La 78,5-123,0	H.D.P.	M.P.	(22)
103	La 80,5-126,0	H.D.P.	M.P.	(22)
137	La 81,7-126,0	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
503	La 83,7-125,8	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
13	La 94,5-99,3	H.D.P.	M.P.	(53)
136	Lb 0 -41,8	H.G.P.	E.H.	vorl.Arbeit
127	Lb 1,5-39,3	H.D.P.	E.H.	vorl.Arbeit
607/35	Lb 5,7-41,3	E.H.	E.H.	vorl.Arbeit
105	Lb 7,6-50,6	H.D.P.	M.P.	(23)
607/34	Lb 7,7-50,6	E.H.	E.H.	vorl.Arbeit

128	Lb 9,6-39,3	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
133	Lb 25,5-65,3	H.G.B.	F.J.Z.	(57)
504	Lb 34,5-72,3	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
106	Lb 40,5-84,3	H.D.P.	M.P.	(23)
505	Lb 43,0-95,5	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
208	Lb 45,5-84,3	H.D.P.	E.H.	vorl.Arbeit
134	Lb 51,4-92,3	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
135	Lb 51,5-92,3	H.G.B.	E.H.	vorl.Arbeit
607/32	Lb 59,8-101,8	E.H.	E.H.	vorl.Arbeit
19	Lb 64,3-99,6	M.P./F.J.Z.	E.H.	vorl.Arbeit
607/31	Lb 64,6-101,8	E.H.	E.H.	vorl.Arbeit

Die Tabelle zeigt die Lage aller bisher charakterisierten Cosmide innerhalb der L-Regionen, bezogen auf den in den Abbildungen 2 und 3 angegebenen Maßstab.

Die verwendeten Namenskürzel stehen für:

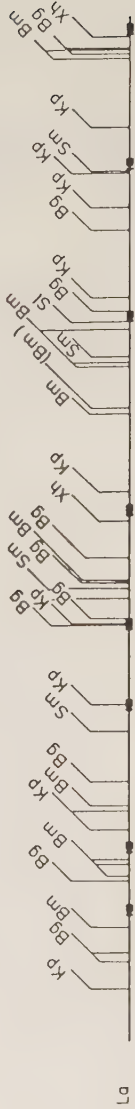
H.G.B.	H.-G. Bauer (41)
H.D.P.	H.-D. Pohlenz (42)
F.J.Z.	F.-J. Zimmer (59)
M.P.	M. Pech (22,23)

cos 21

cos 502

cos 103

cos 502



(m 20-16) (m 20-16)

(m 9-3)

1_I 2_I

3_{II}

4_I

5_I

6_I

7_{II}

8_I

(m 20-16) (m 20-16)

(m 9-3)

(m 20-16) (m 20-16)

(m 9-3)

(m 20-16) (m 20-16)

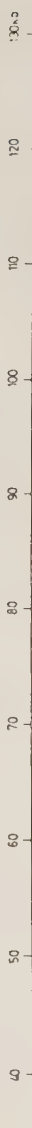


Abb. 2: Die La-Region

Die Abbildung zeigt den heutigen Zustand der La-Region mit einigen der isolierten Cosmide (vgl. Tabelle 1)

Die V_K -Gene sind mit Nummern versehen und die codierenden Bereiche als ausgefüllte Balken eingezeichnet. Der Signalpeptidanteil ist gesondert dargestellt. Durchgehende, dünne Linien kennzeichnen Fragmente, die für Hybridisierungsexperimente subkloniert wurden.

Gestrichelte Linien weisen auf die mit dem jeweiligen, in Klammern genannten, Subklon hybridisierende Region hin.

2.1.1. Cosmidklone aus den Kernbereichen der L-Regionen

Mit Hilfe der V_K I spezifischen Suchprobe m1-3 (53) wurden V_K -tragende Cosmide isoliert (22), die die Basis zur Etablierung der nun vorliegenden Struktur der L-Regionen darstellen (Abb. 1). In einem weiteren Analyseschritt wurden mit Hilfe von V_K II- und V_K III- Proben 28 weitere Cosmide isoliert (41,42), die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund verschiedener Kriterien den beiden L-Regionen zugeordnet werden konnten (Tabelle 1).

Neben dem Vergleich der Größe von Restriktionsfragmenten war die Größe von Fragmenten, die mit Genproben (V_K I-III) sowie Lokalisierungsklonen (m21-1, m105-1) hybridisierten (Tabelle 2), ein entscheidendes Kriterium für das Angliedern dieser neuen Cosmide an bereits etablierte Strukturen (Abb. 2 und 3).

Auffallend ist, daß trotz der großen Zahl von isolierten Cosmiden, diese nicht statistisch auf den Gesamtbereich der L-Regionen verteilt sind, sondern eine deutliche Häufung in zentralen Bereichen auftrat. Es besteht auch keine Korrelation zwischen der Zahl der isolierten Cosmide und der zur Isolierung eingesetzten Hybridisierungsproben (vgl. 3.2). Durch diese neuen Cosmide konnte die Lb-Region sowohl an der 5'-Seite wie auch an der 3'-Seite extendiert werden. Auf der 5'-Seite konnte ein V_K -Gensegment der Subgruppe III im Extensionsbereich

Abb. 3: Die Lb-Region

Dargestellt sind die Restriktionskarten ausgewählter Cosmide (cos 105, cos 127, cos 136, cos 19, cos 106, cos 607/31), welche die Lb-Region überlappend repräsentieren (vgl. Tabelle 1). Die Darstellung der Gensegmente sowie der Subklone und mit diesen hybridisierende Fragmente erfolgte wie in Abb.2 beschrieben. (Die Lokalisierung der BglIII-Stelle bei 4kb erfolgte durch zwei Mitglieder der Arbeitsgruppe, 43,44).

lokalisiert werden. Auf der 5'-Seite der La-Regionen wurden zwei extendierende Cosmide charakterisiert (cos 502, cos 655), hier konnte jedoch kein neues V_K -Gen nachgewiesen werden.

2.1.2. Versuche zur Extension der 5'-Seite der L-Regionen

Ausgangspunkt für Versuche, weitere Cosmide in 5'-Richtung den bisherigen, isolierten Klonen anzugliedern, war das Cosmid 127 (Abb. 3). In diesem Abschnitt der L-Regionen lassen sich nicht wie in den inneren Bereichen die isolierten Cosmide in zwei deutlich unterscheidbare Gruppen einteilen, die den La-oder Lb-Regionen entsprechen (vgl. 2.1.4.). Nach der in 2.2.2. beschriebenen Vorgehensweise wurde auch hier versucht, Suchklone zu konstruieren, die für einen weiteren Schritt des sogenannten "chromosomal walking" geeignet waren. Der Suchklon m127-3 (Abb. 3) erkennt spezifisch die 5'-Flanke der V_{KIII} -Gene der L-Regionen. Dies bringt den Nachteil mit sich, daß auch Cosmide aus dem Kernbereich isoliert werden. Da dieser Suchklon aber auch die 5'-Flanken der auf den Außenseiten der L-Regionen gelegenen V_{KIII} -Gene L7 und L9 erkennt, besteht die Möglichkeit, in einem einzigen Isolierungsschritt extendierende Cosmide für zwei der Außenseiten der L-Regionen zu isolieren. Die mit dem Suchklon m127-3 isolierten Cosmide lagen sämtlich im zentralen Bereich der L-Regionen, das heißt, es ließen sich

keine Cosmide aus den Randbereichen isolieren, obwohl der Klon auch diese Regionen erkennt und aus dem 5'-Randbereich stammt. Dennoch ist dieser Klon ein interessanter Suchklon. Durch seine terminale Lage auf der 5'-Seite der L-Regionen sollte es möglich sein, zusätzliche Cosmid- oder Phagenklone zu isolieren, die wesentliche Beiträge zur Verkürzung des Abstandes zwischen den L- und A-Regionen liefern. Um die Erfolgchancen dieser Suche zu verbessern, ist es sicher nötig, neben Cosmidbanken, bei denen verschiedene Enzyme zur Konstruktion verwendet wurden, auch Phagenbanken abzusuchen. So kann vermieden werden, daß etwaige Unzulänglichkeiten bei der Anwendung nur eines Klonierungssystems auftreten.

Durch Cosmidbankhybridisierungen mit dem Suchklon m105-1 konnten zwei Cosmide isoliert und charakterisiert werden, die aufgrund ihrer Spaltstellenmuster eindeutig der randständigen Ausgangssituation des Suchklons zugeordnet werden konnten (cos 607/34, cos 607/35). Allerdings liegen diese beiden neuen Cosmide gänzlich in bereits charakterisierten Bereichen.

2.1.3. Versuche zur Extension der 3'-Seite der L-Regionen

Neben dem bereits erwähnten Suchklon m127-3, der sich auch für Versuche zur Extension der 3'-Seite der L-Region eignet, wurde ein Suchklon (m19-3) konstruiert, der für gleiche Experimente zur Extension der 3'-Seite der Lb-Region diene.

Dieser Suchklon stammt aus der 5'-Flanke eines V_K I-Genes, wie durch Sequenzanalysen gezeigt werden konnte (vgl. 2.1.6.). In Hybridisierungsexperimenten erkennt dieser Klon ein "Subset" von V_K I-Genflanken (L2, L6, L12, L16, V1, HK 134, Ref. 45). Die entsprechenden Gene sind, sofern es sich um den L-Regionen zugeordnete Gene handelt, genau charakterisiert. Interessanterweise werden aber auch die Genflanken von zwei Genen erkannt (V1, HK 134), die zu Beginn der vorliegenden Arbeit keiner der etab-

lierten Regionen angegliedert werden konnten. Die genomischen Bereiche dieser Gene liegen als Phagenklone vor. Theoretisch sollte es möglich sein, mit Hilfe dieses Klon zu jeder dieser Situationen extendierende Cosmide zu isolieren.

Zwei mit diesem Suchklon isolierte Cosmide (cos 607/31; cos 607/32) extendieren das bereits vorhandene Cosmid 19 (vgl. Abb.3). Im extendierenden Bereich konnte durch Hybridisierungsexperimente ein V_K I-Gen der Subgruppe I nachgewiesen werden. Ein 0,7 kb PvuII-Fragment, das das komplette Gen sowie funktionell wichtige Flankenbereiche enthält, wurde subkloniert und einer Sequenzanalyse unterzogen (vgl. 2.1.6.). Trotz mehrerer Versuche ließen sich für bestimmte Bereiche (Phagenklon λ 1, HK 134) keine entsprechenden Cosmide aus den Cosmidbanken isolieren. Neben einer nicht statistischen Verteilung von zur Klonierung verwendeten Schnittstellen könnten auch für das Cosmid-klonierungssystem nicht kompatible Sequenzen die Ursache für die Schwierigkeiten bei der Etablierung dieser Genombereiche sein (vgl. 3.2.).

2.1.4. Im 5'-terminalen Bereich der Duplikation sind die beiden Kopien möglicherweise sehr ähnlich

Auf der 5'-Seite der L-Regionen gibt es eine Reihe von Cosmiden, die nicht, wie in weiter innen gelegenen Bereichen, spezifische Spaltstellenunterschiede zeigen. Es ist daher nicht möglich, diese Cosmide eindeutig der La- oder Lb-Kopie zuzuordnen. Bei dem Cosmid 105 konnte letztendlich nur über die Sequenzanalysen der Genpaare L1 und L11 eine eindeutige Unterscheidung getroffen werden. Dies ist jedoch eine sehr aufwendige Art der Feinanalyse und auch nur dann von Erfolg beschieden, wenn sich tatsächlich aussagekräftige Unterschiede in den Sequenzen auffinden lassen. Das Beispiel eines Genpaares (O1/O11) aus anderen Regionen (46) zeigt jedoch, daß unter Umständen im codierenden Bereich eines V_K -Gens keine Unterschiede gefunden werden können, d.h. die Duplikate völlig identisch sind. Ein anderer Weg Unterschiede zwischen ähnlichen DNA-Bereichen aufzuzeigen, besteht darin, die zu untersuchende Region mit möglichst vielen, geeigneten Restriktionsenzymen zu zerlegen und die Größen der entstandenen Bruchstücke zu vergleichen. Enzyme der Wahl sind hier diejenigen, die eine Sequenz von vier Nukleotiden erkennen und spalten. Aufgrund der Größe der entstehenden Fragmentschar wäre es unsinnig zu versuchen, Cosmide auf ihrer Gesamtlänge, analog zu den üblichen Restriktionskarten, mit diesen Enzymen zu kartieren. Abhilfe bringt hier der Einsatz von Such- oder Lokalisierungs-klonen. Radioaktiv markiert und für Hybridisierungen eingesetzt erkennen diese nur die Region, aus der sie subkloniert wurden, und homologe Bereiche auf anderen Cosmiden. Gibt es aber Unterschiede in den erzeugten Restriktionsfragmentgrößen, lassen sich diese relativ einfach in Hybridisierungsexperimenten mit den immobilisierten Fragmenten sichtbar machen. Das heißt, daß bei einem Unterschied zwischen den beiden Regionen unterschied-

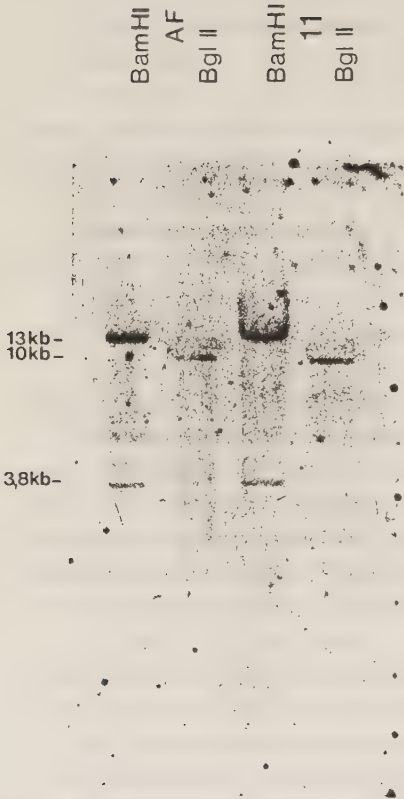
liche Fragmentgrößen erkannt werden und so als diagnostische Fragmentgrößen bei der Zuordnung verwendet werden können. Bei keinem der getesteten Restriktionsenzyme (Sau3A, HaeIII, PstI, RsaI, HpaII, DraI, AluI, SphI, AccI) ließ sich jedoch ein Unterschied zwischen den eingesetzten Cosmiden erkennen. Dies kann zum einen bedeuten, daß die verwendeten Cosmide alle zu einem der beiden Duplikate gehören oder, was wahrscheinlicher ist, daß sich auf dieser Ebene mit den verwendeten Enzymen keine Unterschiede nachweisen lassen. Das heißt, daß die beiden Kopien in ihrem 5'-terminalen Bereich eine besonders hohe Ähnlichkeit aufweisen. In diesem Fall können nur Experimente mit weiteren Lokalisierungsproben oder das Sequenzieren geeigneter Fragmente weiterhelfen. Diese Fragmente müßten auch auf Cosmiden liegen, die aufgrund anderer Kriterien bereits eindeutig zugeordnet werden konnten und eine Überlappung zu den noch nicht zugeordneten Cosmiden aufweisen, um so dem Dilemma zu entgehen, nicht zwischen Allelen und Duplikaten unterscheiden zu können. Es müßten also gleiche Fragmente aus mindestens drei verschiedenen Cosmiden sequenziert werden, um eine klare Zuordnung zu ermöglichen.

Ein zusätzliches Indiz für die große Ähnlichkeit der Duplikate in diesem Bereich sind die Ergebnisse weiterer Experimente. Hierbei wurde auch DNA eines Individuums verwendet, das den V_K -Locus nicht in der duplizierten Form im Genom vorliegen hat (25) und von den L-Regionen nur die La-Kopie besitzt. Als Probe eingesetzt wurde der Suchklon m105-1. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, ist das Bandenmuster der Hybridisierung bei beiden Individuen identisch. Dies bedeutet, daß zumindest dieser Teil der Lb-Region auch in der La-Region vorhanden ist. Analoge Versuche mit Bgl II nachgespaltenen NotI-Fragmenten aus Pulsfeld-Gelelektrophoresen zeigen, daß auch die Suchklone m21-1 und m127-2 die entsprechenden Fragmente in der La-Region detektieren (48).

Zusammengenommen sprechen diese Befunde für die Möglichkeit einer großen Ähnlichkeit der beiden Kopien in diesem Bereich.

Abb.4: Autoradiogramm der
m105-1 Hybridisierung

Gesamt-DNA zweier Individuen (11,AF) wurde jeweils mit BglIII und BamHI gespalten. Das Individuum AF hat den V_K -Locus in duplizierter Form vorliegen, während das Individuum 11 nur diejenige Kopie besitzt, die proximal zum C_K -Gensegment liegt und deren Gene in 5'-3'-Richtung liegen. Von der Gesamt-DNA des Individuums 11 wurde etwa die doppelte Menge aufgetragen. Die Größe der Fragmente, die bei der Hybridisierung ein Signal ergaben, sind am linken Rand des Autoradiogramms angegeben.



m 105-1

2.1.5. Homologieabbruch im 3'terminalen Bereich der L-Regionen

Die Duplikation der L-Regionen wurde mit Hilfe des Subklons m21-1 anhand von Filtermembranen, welche die immobilisierte DNA verschiedener Individuen tragen, gezeigt (23). Dabei macht man sich Spaltstellenunterschiede zwischen den beiden Kopien zunutze. Im zentralen Bereich der L-Regionen gibt es einige dieser Unterschiede, was im Einklang mit der Hypothese der Duplikation einer Vorläuferregion steht, bei der sich nach diesem Ereignis durch Mutationen mit der Zeit Divergenzen zwischen den Duplikaten entwickelten. Vergleicht man jedoch die Restriktionskarten der beiden L-Regionen auf der 3'Seite, so stellt man fest, daß ab einem bestimmten Abschnitt keine Homologie mehr zwischen den beiden Kopien besteht (Abb.5). Dieser Bereich fällt mit der Lage eines V_K I-Genpaares zusammen. Von diesem Genpaar (L5 und L15) waren Sequenzanalysen gemacht worden, die bei L5 das gesamte Gen und bei L15 den Signalpeptidanteil und einen Teil der Intronsequenz beinhalteten. Die Homologie zwischen den bei beiden Genen analysierten Bereichen entspricht der anderer duplizierter Gene der L-Regionen (L1/L11). Allerdings fehlte (bei L15) der für Charakterisierungen besonders interessante Teil, der für den V-Anteil der maturen, leichten Kette codiert. Befunde aus Hybridisierungsexperimenten ließen jedoch drastische Unterschiede in der Signalstärke der jeweiligen Restriktionsfragmente, auf denen diese beiden Gene liegen, erkennen. Dies ließ vermuten, daß die beiden Gene doch nicht in dem Maße homolog sind wie dies die bis dahin verglichenen Sequenzen nahelegten. Daraufhin wurde ein 1,7 kb PvuII-Fragment (Abb.6) subkloniert und die codierenden Bereiche einschließlich des Intron-Anteils sequenziert. Anhand dieser Sequenzen konnte gezeigt werden, daß die beiden Gene nicht ein aus der Duplikation hervorgegangenes Genpaar darstellen (Abb.6).

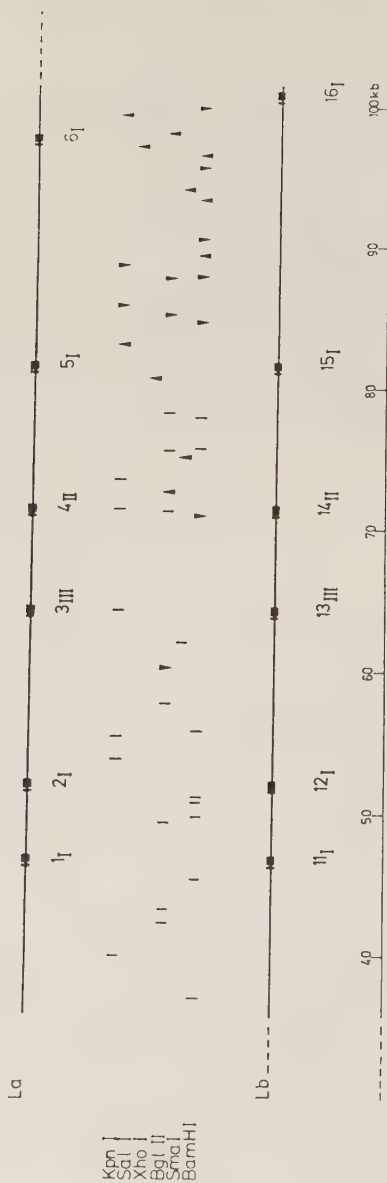


Abb. 5: Homologieabbruch auf der 3'-Seite der L-Regionen

Die Ausschnitte der Restriktionskarten zeigen den Homologieabbruch zwischen den beiden L-Regionen auf der 3'-Seite. Spaltstellenunterschiede zwischen den beiden Duplikaten sind durch Pfeile hervorgehoben, wobei die Pfeilspitze das Vorhandensein einer Spaltstelle andeutet.

Überraschenderweise stimmen die beiden Gene in der 5'-Flanke, dem Signalpeptidanteil und einem Teil der Intron-Sequenz überein, während der Rest der Intronsequenz und der für den V-Anteil codierende Bereich nicht mehr den gleichen Homologiegrad aufweisen. In diesem Sequenzabschnitt zeigt das Gen L15 weniger Sequenzunterschiede zu den anderen Genen als zu L5. Der Homologieabbruch liegt also im Intron dieses Gens. Es bleibt die Frage offen, ob es sich dabei um ein Insertions- oder Deletionereignis handelt oder ob ein anderer Mechanismus diesem Befund zugrunde liegt (vgl. Abb.6c und 3.3.).

Abb. 6: Sequenzstrategie und Sequenz des Gens L 15 sowie Vergleich dieses V_K I-Gens mit anderen Genen derselben Subgruppe

Das Gen L15 wurde nach der dargestellten Strategie sequenziert (6a). Die Pfeile geben die Sequenzierungsrichtung an. Das gesamte Gen wurde mittels eines Subklons (vgl. Tabelle 3; 4.8.) in zwei Orientierungen (ml06-15,16 1,7 kb) sequenziert. Die überlappende Sequenzierung wurde durch Verwendung von hierzu synthetisierten Oligo-Primern (▼) ermöglicht.

6b: In dieser, wie in den folgenden Abbildungen von Nukleotidsequenzen von V_K -Genen, sind die regulatorisch wichtigen pd- und dc-Sequenzen, die TATA-Box (50,51) und die V-J-Umlagerungssignalsequenzen durch Unterstreichung hervorgehoben. Die Grenzen der codierenden Regionen wurde mit Hilfe von veröffentlichten Sequenzen (32) festgelegt. Über den Nukleotidsequenzen sind die formalen Translationsprodukte dargestellt. Die invarianten Aminosäuren (32) sind durch Unterstreichung gekennzeichnet. An Positionen, an denen eine invariante Aminosäure gegen irgendeine andere ausgetauscht wurde, ist dies durch einen darüberliegenden Strich gekennzeichnet. Folgende Abkürzungen wurden für verschiedene V-Gen-Subsegmente verwendet:

L, L' = Signalpeptid; FR 1,2,3 = "Framework Regions"; CDR 1,2,3 = "Complementarity Determining Region"

Die Nukleotid- und Aminosäurepositionen sind am Rand angegeben. Der Beginn der FR1-Region ist bei allen Zählungen als Position 1 definiert.

```

L15  ACGACGCTGTATCCAGCTGCCCAACCCCTGCGGTTTGTGTTCTCCAGACACACCCCTGCCCCAAGCCCTTCTTAATAAGATGCTCACACCTG. 100
L6   CT      GC      T A      T      .....T A      T      A      G      A      A      A      A      T      CA
L8   CT      GC      TT      TCA      A      A      A      A      T      A      G      A      A      C      A      T      CA
L1   CT      GC      . T      T      TCA      A      A      A      A      T      G      A      A      T      T      CT

L15  TGCAGGAGTCAGTCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCGGCTCAGTCCCTGAGTCTCTGAGTCTGATCCCAAGTANGAGAGAGAAC 200
L6   A      T      A      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C
L8   A      T      A      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C
L1   A      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C

L15  ACTAGGAATTTTCTTAGCCCACTGTGCTC.....TGGCACTTCTGGGAAGTTCTCTTATACCATGATTCTGGTGTGATA.TTTGTTTTATGTT 300
L6   A      C      C      G      T      CGTACAGCC      T      GA      C      A      A      TC      A      C      G      A      A
L8   A      C      C      G      T      TGGTACAGCC      C      A      C      A      A      T      A      C      G      A      A
L1   G      C      G      A      C      GG      AGTACAGCC      TA      A      A      CTA      A      T      CCA      G      G      C

L15  TCCAATCTCAGGTGTCAGATTGACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCTTCCCTGCTGCACTGTAGAGACAGAGTCAGTATCATTTGTGGGCAAGT 400
L6   C      G      C      G      C      T      C      C      CAT      C      AC      CC      C      C      C      C      C
L8   C      G      C      G      C      T      C      C      CAT      C      AC      CC      C      C      C      C      C
L1   C      G      C      G      C      T      C      C      CAT      C      AC      CC      C      C      C      C      C

L15  CAGGGCATTAGCAGTAATTTAGCCTGGTATCTGCAGAAACCAGGGAATCCCCAAGCTCTTCTCTATGATCGAAAGATTGACCTGGCTCTCAT 500
L6   C      T      T      T      A      A      A      G      G      C      GA      C      TCCAC      AAG      C
L8   C      T      A      A      G      G      A      A      G      G      C      GA      C      TCCAC      AAG      C
L1   C      T      A      A      G      G      A      A      G      G      T      C      GA      C      TCCAG      A      AAG      C

L15  CGAGGTCAGTGCAGAGGGATCTGGGACGGATTCTCACTCTCACCATCATCAGCCTGAAGCCTGAAGATTITGACGCTTATTACTGTAAACAGGACTTCAG 600
L6   A      C      T      T      A      A      A      A      A      G      T      C      T      A      C      C      TTAAT
L8   A      C      T      T      A      A      A      A      A      G      T      C      T      A      C      C      TTAAT
L1   A      C      T      T      A      A      A      A      A      G      T      C      T      A      C      C      TTAAT

L15  TTACCCCTCCACAGGGTTACAAGCCTGAACATAAGCCCC 639
L6   T      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A
L8   T      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A      A
L1   A      T      T      A      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C      C

```

6c

Beim Sequenzvergleich zwischen den ausgewählten V_K-Genen und L15 (6c) sind alle Nukleotide angegeben, die an der jeweiligen Stelle von der L15 Sequenz abweichen. Das Gen L2, das in diesem Vergleich nicht auftaucht, hat zwischen Nukleotidposition 212 und 639 an 80 Positionen Unterschiede zu L15. Freie Stellen bedeuten Obereinstimmung der V_K-Sequenzen mit dem Gen L15. Bis zur Position 212 gibt es nur drei Austausche zwischen L15 und L5, das ursprünglich als Duplikat angesehen wurde. Ab dieser Sequenzposition jedoch, ist die Homologie zwischen diesen beiden Genen nicht größer, als zwischen anderen V_K-Genen der L-Region und L15.

2.1.6. V_K -Gene der L-Regionen

Durch Extendierung der Lb-Region konnte ein V_K -Gen der Subgruppe I (L16) sowie ein V_K -Gen der Subgruppe III (L9) identifiziert werden (vgl. 2.1.3. und 2.1.4.). Bei dem V_K -Gen L9 (Lb) handelt es sich um ein Gen einer medizinisch relevanten Gruppe von V_K III-Genen (49). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Rheuma (49). Sie codieren den variablen Teil der Antikörpermoleküle, welche die sogenannten Rheumafaktoren darstellen.

Das Gen L9 ist ein potentiell funktionelles Gen. Ein formales Translationsprodukt zeigt, daß alle invarianten Aminosäuren (32) richtig vorhanden sind und keine Stopcodons vorliegen (Abb.8). Die gefundenen regulatorischen Sequenzen (pd, dc, TATA,- Hepta- und Nonamersequenzen, Ref. 50,51,26,27) und die Spleißsequenzen entsprechen den jeweiligen Consensussequenzen.

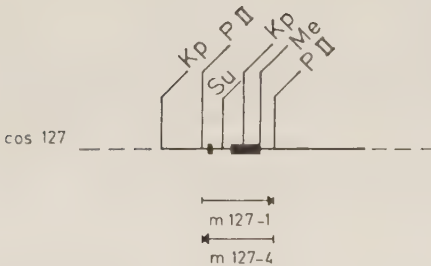
Das Gen L16 ist ein typischer Vertreter der Subgruppe I. Es ist vermutlich ebenfalls ein funktionelles Gen, da in dem gefundenen Leseraster keine Stopcodons vorliegen und bis auf eine Aminosäure alle invarianten Aminosäuren an den Consensuspositionen übereinstimmen (Abb.8). Der Sequenzanalyse dieses Gens vorausgegangen war eine Sequenzanalyse eines Teils seiner 5'-Flanke. Der Grund hierfür war eine mögliche Ähnlichkeit der La- und Lb-Regionen in diesem Bereich, bezogen auf die BamHI-Stelle an Position 100 kb der Lb-Region (Abb.3). Eine BamHI-Schnittstelle gibt es an ähnlicher Position auch in der La-Region (97kb). Von diesem Bereich der La-Region waren mehrere Cosmide isoliert worden, darunter das Cosmid 13 (Abb.9). Dieses zeigt, auf der Ebene der Restriktionsspaltstellen, keinen Unterschied zu anderen Cosmiden aus dem gleichen Bereich. Sequenzanalysen hatten jedoch gezeigt, daß das auf cos 13 lokalisierte Gen (L6'), nicht mit der Sequenz des Gens L6 (vgl. Abb.3) identisch ist (40). Da auf die BamHI-Schnittstelle (100kb) der Lb-Region ebenfalls ein V_K I-Gen folgt wie in der La-Region (97kb), be-

stand die Möglichkeit, daß das Cosmid 13 der Lb-Region und nicht der La-Region zuzurechnen war. Es war also die Frage offen, ob dieses Cosmid (cos 13) eine allelische Situation oder ein Duplikat zu L6 repräsentierte. Anhand der erstellten Sequenzen (m13-1, m19-1 Abb.10) konnte klar gezeigt werden, daß

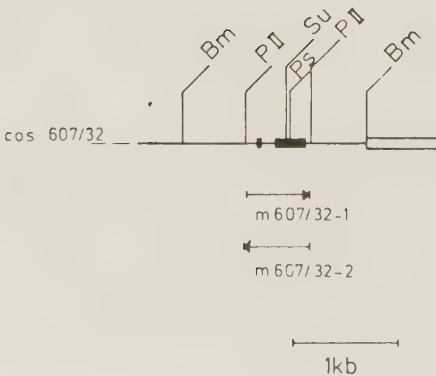
L9 (Lb)

Abb. 7: Sequenzstrategie für die beiden V_K -Gene L9 und L16.

Die Abbildung zeigt die Feinkarte und die Sequenzstrategie für das V_K -Gen L9 und das V_K -Gen L16



L16 (Lb)



das Gen L6' nicht dem oben genannten Bereich der Lb-Region zuzuordnen war. Die 5'-Flanken von L6 und L6' zeigen zwei charakteristische Deletionen (Abb. 10 Pos.51-54, 110-117), die bei L16 nicht vorhanden sind. Die beiden Gene L6 und L6' stellen somit kein Genpaar der Duplikation dar, sondern sind zwei allelische Gene. Die Divergenz zwischen diesen beiden Genen beträgt 3,5% (40). Bei dem Gen L6 handelt es sich um ein Pseudogen. Der Bereich von Nukleotidposition -80 an ist bei diesem Gen stark verändert (vgl. Abb. 10). Dies hat zur Folge, daß das funktionell wichtige dc-Sequenzmotiv nicht mehr vorhanden ist. Interessanterweise ist bei dem Allel L6' dieser Bereich nicht verändert. Da auch die übrigen Regulationssequenzen erhalten sind und das formale Translationsprodukt keine Hinweise auf die Funktion beeinträchtigende Aminosäuren enthält, ist dieses Allel ein funktionelles Gen.

```

                                     L6'
                                     MET L U A L A P R O A L G L M L E U L P H E L E L E U -10
GGGCCCATATCAATGCGTGGGTCAGAGCTCTGGGGAGGAAGTGCCTCAGTTAGGACCCAGACGGAAACCTGGAGGCCCGGCGAGCTTCTCTCTCTCTG -197

LEU LEU THLEU PPOA -4
CTACTCTGGCTCCAGGTGAGGGGAATATGAGGTGGTTTGGCACATCAGTGAAAACCTCTGCCACCTCTGCTCAGCAAGAAATATAATTAATAATTCATG -97

                                     IL FR1
TAGATCAACAATTTGGCTCTACTTAAGACAGCTGGGTTTGATTTGATTACATGAGTGCATTTCTGTTTTATITTCGAATTTTCAGATACCCTGGAGAAA 2
                                     ASP THR THR G L Y C U I 4

                                     ICDR1 FR2
LEVALMETTVRFN SERPORNATHRL EUSERVALSERPORNALVALARGALATHRL EUSERCYSARGALASERGENSERVALSERSERASMLEUALTB 34
TAGTGATGACTCAGTCTCCAGCACCTGTGTGTGTCTCCAGGGAAGAGCCACCTCTCTGACGGGTCAGTCAGAGTGTAGCAGCAACTTAGCGTG 104

                                     ICDR2 FR3
PTVRFNMLVSPORFVFNALAPORARLEU EULETVRFVALASERTHARGALATHRFVILEPORNALAPORPUSERGLYSERGLYSERGLY 67
GTACAGCAGAAACCTGGCAGGCTCCAGGCTCTCTCATCTATGTCGATCCAGCAGGACCTGCTATCCAGCCAGCTTACAGTGGAGTGGAGTCTGG 204

                                     ICDR3
TGTGALPUEHOL EULH L E S E R S R L E U G N S E R F L A S P P H A L A V L T G T V R C Y S G M N I Y R A S N A S N T R P P R O 95
ACTGAGTTCACTCTACCATCAGCAACCTGAGCTCTGGGATTTGGAGTTTATTACTGTCTGAGATATAATAGCTGGCTCTCCACAGTGATTCAACATG 304

AAACAAAACCTCAGTAAGACCATCAGTGTTTACTAG

```

L9

```

GTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGTGCCACCTGCCTTCCCCCTGCTAATTTCATGTTCCAGAGCACATCTCCTCACTCCGAGACTTATTA -231
                                     IL
                                     METASP METARGVALPRODALGLNARGLEIKYLELEULELEUTRPPHE -2
ATGCGCTGGTCACACTTTCATGCAGGAGTCAGACCCGATCAGGACACAGATGGACATGAGGCTGCCCGCTCAGCGCTCTGGAGTCTCTGCTGCTGGTTC -131
                                     IL'
                                     L'
                                     LYALAARGCYSALALEARGMETTHRGNSFRPPPHESERLEUSFRALASERVVALGLYASPARGVOLTHG 20
GACATTGTGTATTATTTCCAATCTCAGGTGCCAGATGTCGATCCGGATGATCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCCTGCATCTGTATGACAGAGTACC 71
                                     |CDR1
                                     |FR2
ILFTHRGVSRPBLASERGLNGLYLESERSEITVRLLEUALATPITVRLNGLNGLYSPPDALALYSALAPOLYSELPHEILEITVRYALASERSEPL 54
ATCACTTGTCTGGGCTAGTCAGGGCATTAGAGTTATTAGCTTGTATCAGCAAAAACCTAGCAAAAACCCCTAAGCTCTTCATCTATTATGATCCAGTT 171
                                     |FR3
GLKNSERGLVSLPROSEEDDPPHESERYYSERGLYSERGLYTHRASPTVYTHRLLEUTHRLICSPSERLEUGLNPQGLVASPPHGLATHTVRYTY 87
TGCAGAGTCTGGGCTCCCATCAGGGTTACGGGAGTGATCTGGGACGGATTACACTCTCACTATGAGAGCTGAGGCTGAAGATTITGCACTTATTA 271
                                     |CDR3
BFLVSLKALNTVRYTYSERTHPPRO 95
CTGTCAACAGTATTATAGTACCCCTCCACAGTGTACACACCCCAAAACAAACCCAGGAGAAAGAGATGTGTGAGGCTGGGCTGGGCTCCCCAGGGG 371

```

L 16

Abb.8 Nukleinsäuresequenzen der V_K-Gene L9 und L16

Die Abbildung zeigt die Nukleinsäuresequenzen der V_K-Gene L9 und L16. Die Kennzeichnung regulatorisch wichtiger Sequenzen, invarianter Aminosäuren sowie Abkürzungen für die V-Gensubsegmente erfolgte wie in Abb.6.

Bei dem Gen L15 (vgl.2.1.5. und 3.3.) handelt es sich vermutlich um ein Pseudogen. Das formale Translationsprodukt enthält zwar weder Stopcodons noch fehlen invariante Aminosäuren, aber es trägt Mutationen in den dc- und Heptanukleotid- Sequenzen (27). Durch die Mutation in der Heptanukleotidsequenz wird eine korrekte Umlagerung vermutlich nicht völlig verhindert, da nur die ersten drei Nukleotide hochkonserviert sind, aber wahrscheinlich erschwert (52). Die Regulation der Transkription des Gens hingegen dürfte, durch die Mutationen in den dc-Nukleotidsequenzen, wesentlich beeinträchtigt sein.

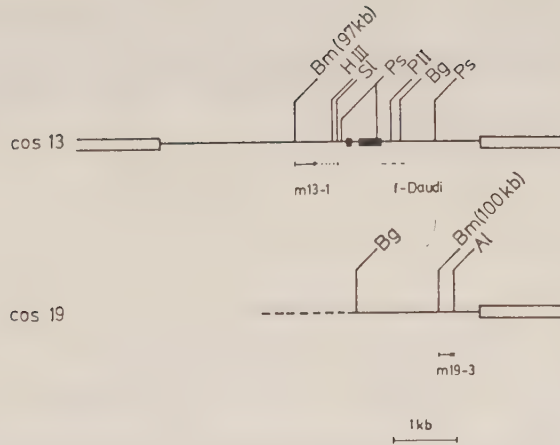


Abb. 9: Sequenzstrategie für die 5'-Flanken der V_κ-Gene L6' und L16

Gezeigt ist die Strategie zur Sequenzierung der 5'-Flanken der beiden V_κ-Gene L6' und L16. Eingezeichnet sind die Subklone m13-1 und m19-1, wobei die Pfeilrichtung die Sequenzierungsrichtung angibt. Sequenzierte Bereiche sind als dünne Linie, klonierte Bereiche als gestrichelte Linie dargestellt. Eine gestrichelte Linie kennzeichnet den Bereich, der zu 99,1% identisch zu der f-Daudi-Flanke ist (54). Auf der 3'-Seite der BamHI-Stelle (100kb) des Cosmides 19 folgt wie in cos 13 in etwa 1kb Abstand ein V_κI-Gen (vgl. Abb.3 cos 607/31). Der klonierte Bereich in Cosmid 19 endet kurz vor Beginn des Gens.

2.2. Beiträge zur Struktur benachbarter Regionen der L-Regionen

Heben den Cosmiden, die sich aufgrund ihrer Restriktionskarten und Hybridisierungsdaten eindeutig einer der beiden L-Regionen zuordnen ließen, gibt es Phagen- und Cosmidklone, die bisher nicht physikalisch den L-Regionen angeschlossen werden konnten. Diese zeigen jedoch bei Hybridisierungsexperimenten charakteristische Merkmale, die eine Lokalisierung in der Nähe der L-Regionen wahrscheinlich machen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, durch weiterführende Experimente die Zuordnungen zu präzisieren.

Weiterhin wurden zwei V_K -Gene (Subgruppe II) aus den direkt benachbarten A-Regionen einer detaillierten Analyse unterzogen.

2.2.1. Lokalisierungsuntersuchungen mit einer niedrig repetitiven Probe aus der 3'-Flanke von V_K I-Genen

Die V_K I-Gene der Subgruppe I der L-Regionen tragen in ihrer 3'-Flanke eine niedrig repetitive Sequenz, die sogenannte "L-Sequenz" (39): Dieses etwa 500 bp lange Sequenzmotiv ist sehr wahrscheinlich bei der Amplifikation der V_K I-Gene mit amplifiziert worden. Ein Teil dieser Sequenzfamilie muß aber auch unabhängig von V_K I-Genen amplifiziert worden sein, da durch Hybridisierungen gezeigt werden konnte, daß L-Sequenzen auch ohne V_K -Gene im menschlichen Genom existieren (39). Dennoch ist der Nachweis von L-Sequenzen auf Phagen oder Cosmidklonen ein starkes Indiz für eine Zugehörigkeit dieser klonierten Genombereiche zu den L-Regionen, sofern auch V_K I-Gene auf diesen Klonen lokalisiert werden können. Neben dem Ansatz, bereits etablierte, größere Bereiche des V_K -Locus durch gezielte Suche mit randständigen Suchklonen in

Cosmidbanken zu erweitern, bieten durch L-Sequenzen klassifizierte Klone einen weiteren Ansatzpunkt.

Es besteht die Möglichkeit, mit Hilfe geeigneter Proben zusätzliche Klone aus Cosmidbanken zu isolieren und so, von benachbarten Regionen aus, die Lücke zwischen diesen und den L-Regionen zu verkürzen und letztendlich zu schließen. Deshalb wurden in einem ersten Analyseschritt bis dahin nicht zu den größeren Regionen L, A, W und O (22,24,25) zugeordnete Cosmide und Phagenklone auf die Existenz von L-Sequenzen hin überprüft. Die Auswertung der Hybridisierung ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der Genflanken, die mit m20-16 hybridisieren

Charakterisiertes Gen	Hybridisierende Fragmente
L1	4,2 kb BamHI
L2	2,8 kb BamHI/KpnI
L5	7,0 kb BamHI
L8	Größe offen, da 3'-vom Gen keine verwertbare Schnittstelle vorhanden
L11	4,2 kb BamHI
L12	2,8 kb Bam/KpnI
L15	7,0 kb BamHI
L16	Größe offen, da 3'-vom Gen keine verwertbare Schnittstelle vorhanden
V1	3,7 kb Bam/KpnI
V4a (L1 Allel)	4,2 kb BamHI
V4b (L2 Allel)	2,8 kb BamHI/KpnI
V5 (A30 Allel)	1,7 kb BglIII/KpnI

Im folgenden konzentrierten sich die Arbeiten darauf, die Lage der positiven λ -Klone, die nicht den L-Regionen direkt zugeordnet werden konnten ($\lambda 1, \lambda 5$) mittels Lokalisierungsklonen genauer einzugrenzen und zusätzliche, erweiternde Cosmidklone zu isolieren.

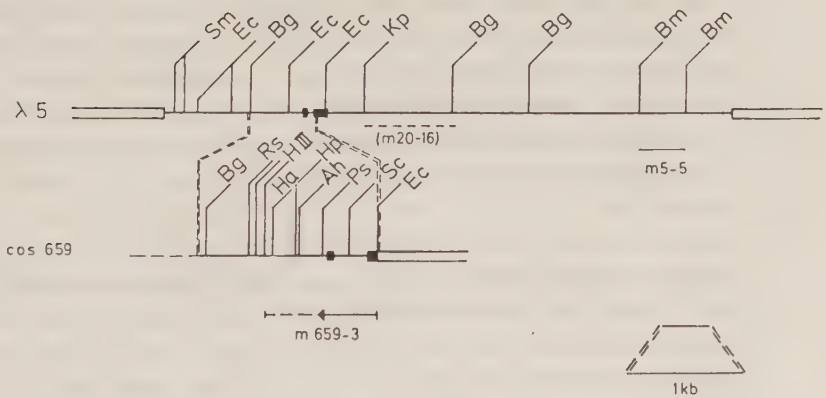


Abb. 11: Restriktionskarte des Phagenklons $\lambda 5$ und Ausschnitt der allelischen Situation des zur Ab-Region gehörenden Cosmides 659

Gezeigt ist die Restriktionskarte des Phagenklons $\lambda 5$ (46,56). Die codierenden Bereiche des V_KI-Gens V5 sind als ausgefüllte Balken eingezeichnet. Eine dünne, durchgezogene Linie markiert das Restriktionsfragment des Subklons m5-5 (vgl. 2.2.2). Allelische Bereiche des Subklons m659-3 (25,48) sind durch eine gestrichelte Linie eingegrenzt.

2.2.2. Zuordnungsversuche von L-Sequenzen tragenden Phagenklonen

Die beiden Phagenklone $\lambda 5$ und $\lambda 1$ (vgl. Abb. 11 und Abb. 12) wurden auf geeignete Fragmente zur Konstruktion spezifischer Such- und Lokalisierungsklone hin untersucht. Die Vorgehensweise war dabei folgende: Jeweils 1 μ g DNA wurde mittels Einzel- und Doppelspaltungen durch Restriktionsnukleasen in charakteristische Fragmente zerlegt und diese, nach Auftrennung in Agarosegelen (57), auf Nitrozellulose-Filter transferiert. Nun wurde der Repetitionsgrad der einzelnen Fragmente mit Hilfe radioaktiv markierter Plazenta-DNA getestet. Mittel- und hoch-repetitive DNA-Sequenzen geben dabei, nach erfolgter Hybridisierung und Exposition der Filtermembranen, ein deutliches Signal (58).

Fragmente bis zu einer gewissen Größe können so als untauglich ausgeschlossen werden. Mittelrepetitive Sequenzen (wenige hundert Kopien) lassen sich jedoch auf diese Art und Weise nicht nachweisen. Die verbleibenden Fragmente werden nun entweder direkt (bei Größen bis ca. 1,5 kb) oder nach Zerlegung in kleinere Fragmente in M13- Vektoren kloniert. Auf diese Weise kann man eine große Anzahl von klonierten Fragmenten auf ihre Spezifität für die Ausgangssituation testen. Im Idealfall erhält man Klone, die bei Hybridisierungsexperimenten mit immobilisierter Plazenta-DNA nur jeweils ein Fragment erkennen. Ein derartiger Klon ermöglicht einerseits eine Aussage über die Lage dieses Suchklons und des entsprechenden Phagenklons innerhalb der mit Pulsfeld-Gelen ermittelten Gesamtstruktur des V_K -Locus.

Andererseits benötigt man derartige Suchklone zur Isolierung weiterer extendierender Cosmidklone. Beim Vergleich der Restriktionskarte des Phagen $\lambda 5$, der ein V_{KI} -Gen und in der 3'-Flanke eine L-Sequenz trägt (Abb. 11), mit den Restriktionskarten anderer Bereiche des V_K -Locus, fiel eine besonders charak-

teristische Abfolge von Spaltstellen auf. Diese war in sehr ähnlicher Anordnung auch auf einem Cosmid, das auf der 3'-Seite der Ab Region liegt (25), vorhanden.

Um die Zugehörigkeit zu dieser Region eindeutig zu zeigen, wurde ein 400 bp langer Randbereich eines aus dieser Region stammenden Subklons (48) sequenziert und mit der entsprechenden Sequenz des Phagen $\lambda 5$ verglichen (46). Damit konnte gezeigt werden, daß die beiden Sequenzen in diesem Bereich völlig übereinstimmen. Die Sequenzanalyse bestätigte also die Zuordnung des Phagenklons $\lambda 5$ zu der 3'-Seite der Ab-Region.

Wie oben beschrieben wurde nun ein Suchklon (m5-5) konstruiert, der spezifisch das 1,3 kb BamHI Fragment auf der 3'-Seite des λ -Klons erkennt (Abb.11). Der Suchklon erkennt außerdem den duplizierten Bereich auf der 3'-Seite der Aa-Regionen, der dem 1,3 kb BamHI Ausgangsfragment der Ab-Region entspricht. Da dieser Abschnitt der Aa-Region noch nicht in Form von Cosmiden vorliegt, wurden gezielt Restriktionsfragmente selten spalten-der Restriktionsnukleasen, die diesen Abschnitt enthalten, zu Hybridisierungsexperimenten herangezogen. Damit konnte gezeigt werden, daß der Klon m5-5 auch den duplizierten Bereich der Aa-Region erkennt (48). Dieser Bereich der A-Regionen zeichnet sich außerdem dadurch aus, daß hier die in den inneren Bereichen vorhandene Homologie zwischen den beiden Duplikaten nicht mehr vorhanden ist (48). Der Suchklon m5-5 erkennt aber auch bestimmte Bereiche der L-Regionen (48). Diese liegen in den 5'- und 3'-Bereichen der Lb-Region. Dadurch ist es prinzipiell möglich, auch hierzu bei einer Suche in Cosmidbanken, extendierende Cosmide zu isolieren. Der Abstand zwischen den L- und den A-Regionen beträgt 40-60 kb, so daß die Möglichkeit besteht, diese Lücke mit Hilfe dieses Klon und von Folgeklonen zu schließen. Dadurch läßt sich dann der Homologieabbruch in diesem Bereich genau charakterisieren, denn interessanterweise zeichnen sich die auf der 3'-Seite der Lücke liegenden L-Regionen, in dem angrenzenden Abschnitt, durch eine besonders hohe Ähnlichkeit zwischen den Duplikaten aus. Eine mögliche

Erklärung für diesen Homologieabbruch der A-Regionen wäre eine Deletion oder Insertion in einem der beiden A-Duplikate. Der Phagenklon $\lambda 1$ trägt das $V_K I$ -Gen, aus dem die Suchproben m1-1 und m1-3 konstruiert worden waren (53). Mit diesen Proben wurden die ersten in dieser Arbeitsgruppe erstellten Cosmid-banken abgesucht und die Basis der Cosmidklone der Regionen des V_K -Locus erstellt. Dennoch ist es nicht gelungen, die genomische Region von $\lambda 1$ auch als Cosmidklon zu etablieren. Möglicherweise sind Unterschiede in der Signalstärke von Kolonien, die Cosmide mit mehreren $V_K I$ -Genen enthalten, ein Grund dafür.

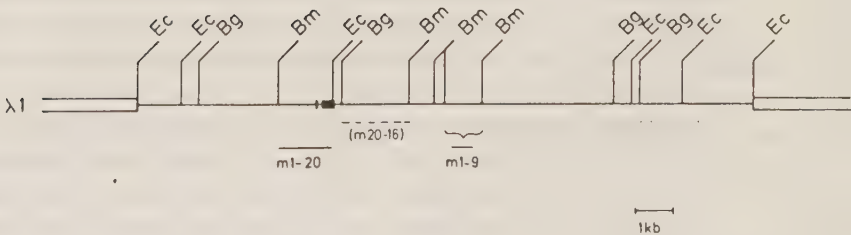


Abb. 12: Restriktionskarte des Phagenklons $\lambda 1$

Dargestellt ist die Restriktionskarte des Phagenklons $\lambda 1$ (46,53). Die codierenden Bereiche des $V_K I$ -Gens sind als aus-Balken eingezeichnet. Eine durchgezogene Linie kennzeichnet den Teil des BamHI-Fragmentes, der für die Konstruktion des Suchklons m1-9 verwendet wurde. Gepunktete Linien weisen auf hochrepetitive Bereiche hin. Eine gestrichelte Linie kennzeichnet den Bereich, der mit dem Flankenklon m20-16 hybridisiert (39).

Auch aus diesem Grund wurde ein Suchklon (m1-9) konstruiert, der spezifisch für ein BamHI-Fragment (Abb.11) von $\lambda 1$ ist. (dazu wurde das 1,0 kb BamHI-Fragment durch Spaltung mit Sau3A auf 0,6 kb verkürzt. Dieses verkürzte Fragment wurde dann in die BamHI-Stelle des Vektors M13mp10 kloniert). Außerdem läßt sich, im Gegensatz zu einer subgruppenspezifischen Probe, mit einem derartigen Klon auch die Lage des Phagenklons $\lambda 1$ bezüglich anderer Regionen des V_K -Locus bestimmen. Versuche, mit Hilfe dieses Klons aus zwei verschiedenen Genbanken die gesuchten Cosmidklone zu isolieren, waren jedoch vergeblich. Die Gründe sind wohl auch hier (vgl.2.1.2.) für dieses Klonierungssystem nicht kompatible Sequenzen. Für eine Lokalisierung in der Nachbarschaft der L-Regionen sprechen wie bei $\lambda 5$ die auf der 3'-Seite des V_K -Gens gelegenen L-Sequenzen. Es war zu Beginn dieser Arbeit außerdem noch die Frage offen, ob das $V_K I$ -Gen von $\lambda 1$ dupliziert vorliegt. Eine Klärung dieser Frage würde die Lokalisierung sehr vereinfachen, da von den noch nicht klonierten Bereichen die meisten dupliziert sind. Eine nichtduplizierte Region ist die B-J_K-C_K-Region, die nur einmal im Genom existiert (60). Ein direkter Anschluß an diese Region, war aufgrund der Daten der Restriktionskarten nicht gegeben. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß sich diese nur einmal vorkommende Region weiter erstreckt als die bisher etablierten Klone. Der Übergang zwischen dieser singulären Region und den duplizierten Bereichen des V_K -Locus liegt zwischen den L-Regionen und der B-J_K-C_K-Region. Eine nähere Charakteri-

tische Vorstellungen dazu sind sicher nur möglich, wenn auch dieser Bereich in klonierter Form vorliegt. Dies erst ermöglicht dann auf molekularer Ebene Einblicke in den bei der Entstehung von Multigenfamilien so wichtigen Vorgang der Duplikation .

2.2.3. Sequenzanalysen zweier Gene der A-Regionen

Wie oben erwähnt liegen die beiden A-Regionen in unmittelbarer Nachbarschaft der L-Regionen. Der Abstand zwischen diesen beiden Genombereichen beträgt nach den bisherigen Daten deutlich weniger als 100 kb (37). Zwei Gene der Subgruppe II aus den A-Regionen, A5 und A23, wurden einer Sequenzanalyse unterzogen. Durch Hybridisierungsexperimente konnten die codierenden Bereiche stark eingeeengt werden und die Polarität der Gensegmente ermittelt werden. Die Sequenzstrategien und die Feinkartierungen sind in Abb. 13 angegeben. Das Gen A5 muß aufgrund der Sequenzdaten als Pseudogen eingestuft werden. Ein formales Translationsprodukt läßt sich nur erstellen, wenn man an Position 42 und an Position 140 eine Deletion und an Position 132 eine Insertion vornimmt. Andere Leseraster sind durch das Auftreten zahlreicher Stopcodons von vornherein unsinnig (siehe Abb. 14). Führt man jedoch die oben genannten Änderungen ein, so stimmen die Positionen der meisten invarianten Aminosäuren (32). Die Signalsequenzen (Heptanukleotid- und Nonanukleotidsequenz, pd und dc-Nukleotidsequenz) und die Spleißsequenzen stimmen mit den üblichen Consensussequenzen überein. Dieses Gen ist also durch eine Insertion und zwei Deletionen zum Pseudogen geworden.

Das Gen A23 ist vermutlich zum Unterschied von A5 ein funktionelles Gen. Es befinden sich keine Stopcodons im

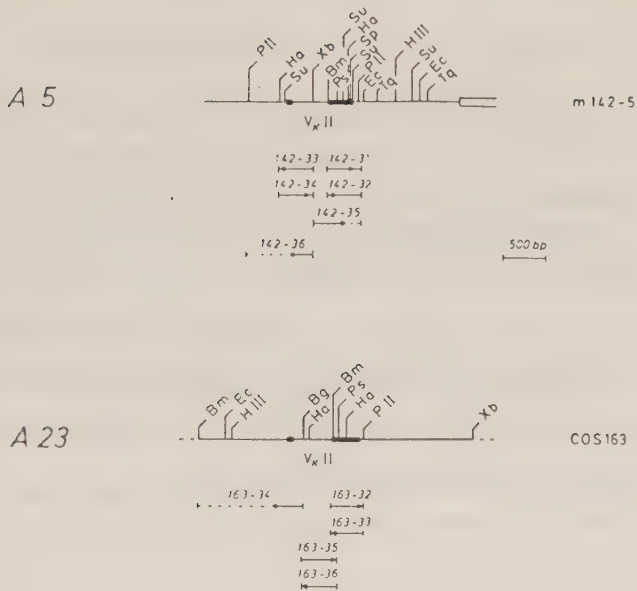


Abb. 13: Feinkartierung und Sequenzstrategie für die V_K-Gene A5 und A23

Dargestellt sind die Feinkartierungen zweier Bereiche aus den A-Regionen, die das V_K-Gen A5 (cos 140-1) und das V_K-Gen A23 (cos 136) enthalten. Zur Sequenzierung geeignete Fragmente (durch Hybridisierungen konnten die codierenden Bereiche eingegrenzt werden) wurden in M13 Vektoren umklontiert. Die Sequenzierungsrichtung wird durch die Pfeile angegeben. Bereiche auf den Sequenzklonen, die nicht mehr sequenziert wurden, sind gestrichelt dargestellt. Die codierenden Bereiche sind als geschlossene Balken eingezeichnet.

Leseraster, Signal- und Spleißsequenzen sind korrekt vorhanden, und die Austausche invarianter Aminosäuren führen wahrscheinlich nicht zu einer funktionsstörenden Änderung der Raumstruktur (61).

[illegible]

A 23

Abb. 14: Nukleinsäuresequenz der V_K -Gene A5 und A23

Die Kennzeichnung von charakteristischen Bereichen und Sequenzen der beiden V_K -Gene entspricht derjenigen der Abb.9.

Das formale Translationsprodukt des Gens A5, das die meisten invarianten Aminosäuren an der richtigen Position hat, wurde erstellt unter der Annahme zweier Deletionen und einer Insertion. Diese sind in der Sequenz durch Sternchen gekennzeichnet.

3. Diskussion

3.1. Strukturanalyse des menschlichen V_K -Locus

Ein Ziel der Arbeitsgruppe von Professor Zachau ist es, die Struktur des menschlichen V_K -Locus zu ermitteln. Die Basis hierfür ist die überlappende Kartierung der V_K -Gene tragenden genomischen Bereiche mittels Cosmid- und Phagenklonen. Dadurch kann die Anzahl und Orientierung der V_K -Gene ermittelt werden. Sequenzanalysen liefern dann Aussagen darüber, ob es sich um funktionelle Gene oder um Pseudogene handelt. Zusätzlich wurden auch Analysen vorgenommen, welche die chromosomale Lokalisierung einiger klonierter Bereiche betreffen. Nicht sämtliche etablierten Cosmidklone liegen innerhalb des V_K -Locus auf Chromosom 2. Es konnte gezeigt werden, daß auch auf anderen Chromosomen V_K -Gensegmente existieren (38). Da die Umlagerung an das C_K -Gensegment bei diesen transponierten Genen nicht möglich ist, müssen diese aufgrund der chromosomalen Lage als Pseudogene eingestuft werden. Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte kann die Anzahl der funktionellen V_K -Gene des Menschen ermittelt werden. Dadurch kann zum ersten Mal der Anteil des Keimbahnrepertoires an der Diversität der Antikörper exakt bestimmt werden.

Neben der Klärung immunologisch wichtiger Fragen bieten die ermittelten Daten die Möglichkeit, Einblicke in die molekularen Vorgänge bei der Entstehung und Evolution von Multigenfamilien zu gewinnen. Ansätze hierzu sind die nachgewiesene Duplikation mehrerer Regionen des V_K -Locus, Sequenzdaten über Homologieabbrüche innerhalb duplizierter oder transponierter Bereiche sowie die Charakterisierung von Elementen, die möglicherweise mit der Überreplikation und Transposition einzelner Genomabschnitte in Zusammenhang stehen (62).

3.2. Vorkommen verschiedener Genombereiche in Cosmidbanken

Das Absuchen von Cosmidbanken zur Isolierung und Charakterisierung von Klonen, die genomische Bereiche des V_K Locus tragen, erfolgte in zwei Phasen. In der ersten Phase wurden die erstellten Cosmidbanken mit Proben der V_K -Gene der Subgruppen I-III abgesucht. Dadurch war es möglich, gleichzeitig von mehreren Stellen des V_K -Locus aus die überlappende Kartierung in Angriff zu nehmen.

Nachdem schon erhebliche Teile der einzelnen Regionen etabliert waren, wurden Suchklone, spezifisch für die jeweiligen Ränder, konstruiert. Damit wurden dann gezielt diese Bereiche extendiert. Es zeigte sich jedoch, daß die isolierten Cosmide nicht gleichmäßig über die charakterisierten Bereiche verteilt waren. Nicht überall war die gewünschte Staffellung der Cosmide gegeben, die eine Voraussetzung für die Technik des "chromosomal walking" zur Extension isolierter Genombereiche ist. Dies konnte auch durch die Anwendung verschiedener Enzyme (Sau3A, MspI, TaqI, HindIII, BglII) bei der Konstruktion der Cosmidbanken nicht in dem gewünschten Maße beeinflußt werden. Der Grundgedanke für diese Strategie war die Überlegung, daß die Verteilung von Schnittstellen eines Enzyms nicht völlig statistisch ist. Eine Anhäufung der Schnittstellen aber hätte zur Folge, daß überproportional viele Cosmide aus dem gleichen Bereich isoliert werden und ein Überlappen durch extendierende Cosmide nicht möglich ist. Eine mögliche Ursache kann in dem verwendeten Klonierungssystem selbst liegen. Nach Transformation der Wirtszelle durch das verpackte Cosmid (63) liegt dieses in der Zelle zirkulär vor und wird wie ein Plasmid repliziert (64,65). Dies setzt voraus, daß die auf dem Cosmid enthaltenen genomischen Bereiche nicht in irgendeiner Weise mit dem Stoffwechsel der Bakterienzelle interferieren. Das Auftreten solcher inkompatiblen Sequenzen hätte zur Folge, daß die Zellen in ihrem Wachstum erheblich beeinträchtigt werden

oder absterben. Entsprechende klonierte Bereiche stehen dann in einer Cosmidbank nicht mehr oder nur noch sehr bedingt zur Verfügung. Bei der Anwendung von Phagenbanken spielen diese Gesichtspunkte eine geringere Rolle, da die Phagen bei ihrer Vermehrung immer eine Lyse der Wirtszelle einleiten. Es kann also für die Extension bestimmter Abschnitte, trotz der geringeren Einbaugröße des Phagensystems, durchaus von Vorteil sein, dieses Klonierungssystem zu verwenden.

3.3. Mögliche Mechanismen bei der Entstehung des Homologieabbruchs innerhalb der L-Regionen

Der Homologieabbruch zwischen den Regionen La und Lb konnte durch Sequenzierung des Gens L15, das innerhalb des durch Kartierungen eingegrenzten Bereichs liegt, im Intron des Gensegmentes L15 lokalisiert werden. Bei einem Vergleich dieser Sequenz mit den Sequenzen anderer V_K I-Gene fällt auf, daß der hohe Homologiegrad zu dem Gen L5, das an entsprechender Stelle in der La-Kopie liegt, nur für den Signalpetidabschnitt gilt und nicht für den Genbereich (vgl. Abb.6). Da dieser Abbruch innerhalb des Introns des V_K -Gensegmentes liegt, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß dies nicht durch ein Deletions- oder Insertionsereignis verursacht wurde. Vielmehr wird angenommen, daß aufgrund der ausgeprägten Homologie der V_K I Gensegmente untereinander ein ungleiches Cross-over zwischen den beiden Allelen der Lb-Kopien die Ursache für den vorliegenden Befund ist (Abb. 15). Aus dem schematischen Ablauf ergeben sich neben der Zusammensetzung des Gens L15 auch Konsequenzen für die Abfolge der einzelnen Gensegmente in den Lb-Allelen vor und nach dem Rekombinationsereignis. Es wird dabei davon ausgegangen, daß zu einem frühen Zeitpunkt nach der Duplikation die Vorläufer der Duplikate La und Lb sehr ähnlich waren. (Dabei entsprachen sich jeweils die Genpaare L1/L11, L2/L12, ...). Dies bedeutet, daß zu diesem frühen Zeitpunkt auch die entsprechenden Gene zu L6, L7 und L8 (die drei nicht bezeichneten Gene in der Abbildung) aus der La-Kopie in der duplizierten Lb-Kopie vorhanden gewesen sein sollten. Aus diesen Annahmen läßt sich das in der Abbildung 15 dargestellte Schema ableiten. Durch den Austausch zwischen den Partnern ("L15" und X) des ungleichen Cross-over geht die Information für drei ursprünglich vorhandene Gensegmente auf dem einen Allel verloren. Dieses Allel entspricht der rezenten Lb-Situation. Das reziproke Produkt dieser Rekombination enthält drei zusätzliche Gensegmente.

Diese nicht benannten Gensegmente stellen die Duplikate zu den oben erwähnten Gensegmenten L6, L7 und L8 dar. Die bearbeiteten Cosmide repräsentieren diejenige Situation (La und Lb), in der das Lb Allel in der verkürzten Form vorliegt. Das reziproke Produkt dazu wurde nicht isoliert. Trifft die dargestellte Möglichkeit der Genanordnung bei den Vorläufern (La und Lb) zu (Abb. 15), so hätte dies die Konsequenz, daß auf der 3'-Seite des jetzigen randständigen Gens L8 der La-Kopie noch zwei weitere V_K I-Gene, die Duplikate zu den Genen L15 und L16 der Lb Kopie, vorhanden sein müßten. Im Falle des Gens L15 würde sich die Homologie vom V_K -Gensegment bis an die in Abb. 6 dargestellte Position im Intron erstrecken, während der weiter 5'-gelegene Teil des Introns und der Signalpeptidanteil dem teilweise noch unbekannten Gen entspricht, mit dem der Informationsaustausch stattgefunden hat. Das Gen in der La-Kopie, das dem Gen L16 entspricht ("L16?"), sollte im gesamten Genbereich zu L16 homolog sein.

Abb.15: Schematische Darstellung eines ungleichen Cross-over zwischen Allelen der Lb-Kopien

Die Abbildung zeigt im oberen Abschnitt die Entstehung der La- und Lb-Vorläufer aus einem L-Vorläufer durch Duplikation. Die als Vorläufer I und II bezeichneten Abschnitte stellen Vorläufer der heutigen Lb-Situation dar. Es handelt sich dabei um zwei Allele (I und II), die in der Abfolge der einzelnen Gensegmente vermutlich identisch waren. Der Austausch der genetischen Information erfolgte nach diesem Schema nicht zwischen zwei homologen V_K -Gensegmenten dieser beiden frühen Allele, sondern zwischen zwei nichthomologen V_K -Gensegmenten der gleichen Subgruppe (V_{KI}). Das daraus resultierende Gen ist daher aus zwei verschiedenen V_K -Gensegmenten zusammengesetzt. Aufgrund der Sequenzdaten des rezenten Gens L15 und Vergleich mit L5 wird die Rekombinationsstelle im Intron vermutet (vgl. 2.1.5.). Das heißt, Signalpeptid und ein Teil des Introns stammen von dem Gen "L15", während der Rest des Introns und der V-Anteil von dem Gen X stammen. Alle Gensegmente des einen Lb-Allels sind durch ausgefüllte, die des anderen durch leere Balken gekennzeichnet. Die Numerierung der Gensegmente entspricht derjenigen der isolierten Lb-Kopie (vgl. Abb.3). Die drei nicht bezeichneten Gensegmente der beiden Vorläufer I und II, stellen Duplikate der entsprechenden Gene L7, L8 und L9 der La-Kopie dar. Die beiden Gene, die als Partner des ungleichen Cross-over fungierten, sind als "L15" und X bezeichnet. Das daraus resultierende, zusammengesetzte Gen wird als L15 (entsprechend der Nomenklatur für die heutige Situation) bezeichnet.

Die Abbildung veranschaulicht die sich aus dem Austausch ergebenden Konsequenzen für die Abfolge der Gene auf der La- und der Lb-Kopie. Beide Kopien waren ursprünglich in Bezug auf Zahl und Abfolge der Gene identisch. Die den Genen L6, L7 und L8 des La-Vorläufers entsprechenden nicht bezeichneten Gene des Lb-Vorläufers sind in der heutigen Form der Lb-Kopie nicht mehr vorhanden. Eine weitere Folgerung ist, daß die bei dem La-Vorläufer vorhandenen Gene "X" und "L16" möglicherweise noch existieren und demnach auf der 3'-Seite der heutigen La-Kopie liegen ("X"? und "L16"?). Das reziproke Produkt und die heutige Lb-Kopie wurden durch die Meiose voneinander getrennt. Die hier gezeigte Möglichkeit der Rekombination ist die einfachste von mehreren Varianten. Die anderen Varianten sind nur unter der Annahme weiterer Deletionen möglich.

3.4. Gesamtstruktur der V_K -Multigenfamilie

Auf dem gegenwärtigen Stand der Strukturaufklärung des menschlichen V_K -Locus ergibt sich folgendes Bild:
Auf zwei NotI-Fragmenten von 0,85 und 1,05 Mb liegen die duplizierten Regionen A, L und O sowie die B- J_K - C_K -Region (37,70). Die letztgenannten liegen auf dem größeren NotI-Fragment. Die W-Regionen (59) liegen außerhalb dieser NotI-Fragmente, aber ebenfalls auf Chromosom 2. Es konnte eine Reihe von transponierten V_K -Genen charakterisiert werden, die auf anderen Chromosomen lokalisiert sind (38). Die Orientierung der V_K -Gene innerhalb eines Duplikats ist gleich, die beiden Kopien jedoch sind wahrscheinlich invers angeordnet. Dies bedeutet, daß die Gene nach verschiedenen Mechanismen bei einer primären Umlagerung an eines der J-Gensegmente angeschlossen werden (66,67,68,69). Innerhalb der einzelnen Regionen sind die Gene nicht nach Subgruppen geordnet. Vielmehr liegt eine gemischte Reihenfolge vor. Diese wurde vermutlich durch Transposition von Gensegmenten nach den primären Amplifikationsprozessen bei der Entstehung der V_K -Multigenfamilie verursacht. Dennoch liegen die Subgruppen nicht gleichmäßig vermischt vor, sondern die Regionen weisen unterschiedliche Häufigkeiten der Subgruppen auf. Ein überraschender Befund war der relativ hohe Anteil der Pseudogene. Von den bis jetzt im Locus nachgewiesenen 72 Genen sind 34 Pseudogene. Die außerhalb des V_K -Locus lokalisierten Gene weisen nach den bisherigen Sequenzdaten mehr oder weniger starke Mutationen auf, die ihren Pseudogencharakter verstärken. Die bei Sequenzanalysen gefundenen Mutationen reichen von Punktmutationen, die zu Stopcodons oder zum Austausch unerläßlicher Aminosäuren führen, über kleinere Insertionen und Deletionen im Strukturbereich der Gene und in funktionell wichtigen Signalsequenzen bis zur Deletion größerer Bereiche innerhalb der V_K -Gensegmente. Die mit Pulsfeld-Gelen gezeigte Grobstruktur bestätigt und erweitert das durch die

überlappende Kartierung entstandene Bild des V_K -Locus (37). Dadurch konnten auch die noch fehlenden Bereiche zwischen den A- und L-Regionen sowie der $B-J_K-C_K$ -Region größenordnungsmäßig bestimmt werden. Diese liegen zwischen 40 und 60 kb für den Zwischenbereich der L- und A-Regionen und um 150 kb für den Bereich zwischen der $B-J_K-C_K$ -Region und der La-Region (37).

3.5. Implikationen der Strukturdaten für die Evolution von Multigenfamilien

Die bisher gewonnenen Daten lassen Einblicke in generelle Vorgänge zu, die bei der Entstehung und Veränderung von Multigenfamilien beteiligt sind. Die Transposition von Genen innerhalb des V_K -Locus und auf andere Chromosomen kommt wahrscheinlich auch bei der Veränderung anderer Multigenfamilien vor. Bei einer Familie von transponierten Genen, der sogenannten Z-Familie (47), erstrecken sich die Flankenhomologien weit über die transponierten Gene hinaus (bis zu 50 kb). Dies zeigt, daß auch Genomabschnitte, die wesentlich größer als Gene sind, transponiert werden können. Bei einem Teil der transponierten V_K -Gene konnten Sequenzelemente in der 5'-Flanke identifiziert werden, welche möglicherweise bei der Initiation der Transposition dieser Gene eine Rolle gespielt haben oder zumindest Voraussetzungen geschaffen haben, die Transpositionsergebnisse erleichtern.

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Homologieabbruch ist vermutlich die Folge eines ungleichen Cross-over zwischen den V_K I-Genen zweier Allele der Lb-Regionen. Dies würde die Bedeutung des Mechanismus bei der Umgestaltung von Multigenfamilien bestätigen. Unter populationsgenetischen Gesichtspunkten ist interessant, daß nicht alle Individuen eine Duplikation des V_K -Locus aufweisen. Diese und andere Daten aus dem V_K -Locus können so Grundlagen zum Verständnis von Genomveränderungen bilden.

4. Materialien und Methoden

4.1. Chemikalien und Enzyme

Hefeextrakte wurden von Merck, Darmstadt bezogen. Bactoagar und Bactotrypton stammen von der Firma Difco, Detroit, USA. Ampicillin (Amblosin) stammte von der Bayer AG, Leverkusen. Nicht gesondert aufgeführte organische und anorganische Reagenzien, sowie SDS, Ethidiumbromid, PEG (Polyethylenglykol) 6000 und Tris sind von der Firma Merck, Darmstadt bezogen worden. Polyvinylpyrrolidon, Rinderserumalbumin (BSA) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-gal) sind Produkte der Firma Sigma GmbH, München. Acrylamid und N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED) stammten von der Firma Serva Feinbiochemica Heidelberg und Bisacryl von der Firma Biomol, Ilvesheim. Dimethyldichlorsilan ist von BDH Chemicals, Ltd., Poole, England und Methacryloxypropyl-trimethyloxysilan von Wacker-Chemie, München bezogen worden. Die Firma Biorad, Kalifornien lieferte den Mischbetaustauscher AG 501-X8.

Die radioaktiven Nukleotide (α - ^{32}P) dATP und (α - ^{32}P) dCTP stammten von New England Nuclear (NEN), Desoxy, Didesoxynukleotide und Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) von der Firma Boehringer Mannheim. Der Einzelstrangprimer (17bp) der Firma P.L.Bio-chemicals, Milwaukee, USA wurde bei Sequenzierungen verwendet.

Alle verwendeten Restriktionsnucleasen stammten von Boehringer Mannheim.

Ebenfalls von Boehringer Mannheim bezogen wurden die T4-DNA-Ligase, Desoxyribonuclease, DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) RNase A sowie alkalische Phosphatase (Kälberdarm).

4.2. Bakterienstämme, Vektoren und DNAs

Als Wirtsstamm für rekombinante M 13 Phagen wurde der Bakterienstamm Jm 103 (lac, pro, thi, str.A, supE, endA, sbc15, hsdR4, F'traD36, pro AB, laqI, Z M15) verwendet. Dieser sowie die von J.Messing (72) konstruierten M13 Phagen wurden von der Firma P.L.Biochemicals, Milwaukee, USA bezogen. Die Propagation rekombinanter Cosmide und Plasmide erfolgte im Bakterienstamm E.coli 490 A, der von G.Hobom (73) zur Verfügung gestellt wurde. E.coli und Lachsspermien-DNA stammen von Sigma GmbH München, - Phagen-DNA (c1857 Sam 7) und pHc 79 DNA stammen von Boehringer, Mannheim.

4.3. Cosmidgenbanken und Hybridisierungsproben

Die Genbanken III und IV wurden von H.D.Pohlenz bzw. B. Straubinger etabliert (42,74). Bei der Genbank III handelt es sich um eine mit Sau 3A partial-gespaltene Placenta-DNA (St.), die in die BamHI-Schnittstelle des Cosmidvektors pHc 79 bzw.pJB 8 kloniert wurde. Bei der Genbank IV wurde die Placenta DNA (St.) mit MspI bzw. TaqI gespalten und in die ClaI Schnittstelle des Vektors pHc 79 kloniert. HindIII gespaltene Zelllinien DNA (GM607) wurde in die HindIII-Stelle des Vektors Lorist 2 kloniert. Genbank 607 wurde von H.G.Klobeck etabliert. BglII gespaltene Placenta-DNA (AF) wurde zur Herstellung der Genbank V in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pHc 79 kloniert (48). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Hybridisierungsproben wurden von verschiedenen Mitgliedern der Arbeitsgruppe konstruiert und zur Verfügung gestellt (Tab.3). Die dabei eingesetzten Fragmente wurden nach Isolierung aus Seaplaque Agarosegelen hochligiert (75,76,77).

4.4. Restriktionskartierung

Bei analytischen Einzel- oder Mehrfachspaltungen von Cosmid- und Plasmid-DNA wurden jeweils zwischen 0,5-1 μ g DNA mit einem leichten Überschuß an Restriktionsenzym für zwei Stunden inkubiert. Die Temperatur entsprach den von dem Hersteller angegebenen Bedingungen.

Mit Ausnahme von KpnI wurde in allen Fällen ein Universalpuffer (T.Igo-Kemenes) folgender Zusammensetzung verwendet: 1,5mM Spermin, 5mM Spermidin, 150mM Tris pH7,5, 400mM KCl, 150 mMNaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 70mM MgCl₂, 3-5mM Mercaptoethanol. Beendet wurden die Restriktionsspaltungen durch Zugabe von 25 Volumenprozent einer Lösung von 50% (w/v) Saccharose, 50mM EDTA, 0,1% (w/v) Bromphenolblau. Die Auftrennung erfolgte auf Agarose-gelen.

4.5. Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Restriktionsspaltungen von Cosmid- und Plasmid-DNA, bzw. genomischer DNA entstandenen Fragmentgemische wurden zur Größenbestimmung elektrophoretisch aufgetrennt (55). Die Agarosekonzentration (Seakem Agarose, Marine Colloids Inc., Rockland, Maine USA) variierte zwischen 0,5% und 1,2% je nach Größe der DNA-Fragmente. Als Elektrophoresepuffer diente ein Tris-(EDTA)-Boratpuffer (90mM Tris, 2,5mM EDTA, 90mM Borsäure). Analytische Auftrennungen sowie die Auftrennung genomischer DNA erfolgte in Horizontalgelen. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurden 0,5%ige Gele aus Seaplaque Agarose (Marine Colloids Inc., Rockland, Maine USA) gegossen.

Nach erfolgter Auftrennung wurde die jeweilige DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten, auf 0,5M NaCl eingestellt und bei 65°C zum Schmelzen gebracht. Dieses Gemisch wurde einer Phenol-extraktion unterzogen und anschließend eine Ethanol-fällung der DNA durchgeführt.

4.6. Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmid- und M13 Phagen Vektoren

Für Hybridisierungs- und Sequenzierungsexperimente benötigte DNA-Fragmente wurden je nach Größe und Verwendungszweck in Plasmid- oder M13 Phagen Vektoren umkloniert. Mit den entsprechenden Restriktionsnukleasen gespaltene M13-DNA mp8, mp9, mp10, mp11 (72) und mp18 und mp19 (78) sowie pUC9-DNA (79) wurde mit alkalischer Phosphatase behandelt, um entstehende Phosphatgruppen zu entfernen. Dadurch wird eine Religierung der Vektoren verhindert (80). Die DNA-Fragmente wurden zusammen mit den so präparierten Vektoren über Nacht bei 15°C mit Hilfe von T4-DNA-Ligase ligiert (81). Nach der Methode von Dagert und Ehrlich (82) für die DNA-Aufnahme kompetente JM103 Zellen wurden wie von J. Messing (72) beschrieben mit den oben erzeugten Konstrukten transfektiert.

Aufgrund einer Farbreaktion bilden rekombinante Phagen weiße Plaques, während nicht rekombinante Phagen blaue Plaques bilden. Die rekombinanten Phagen wurden mittels eines Zahnstochers in eine JM103 Vorkultur (logarithmische Wachstumsphase, OD=0,5) überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Isolierung der doppelsträngigen Phagen-DNA aus den Bakterien erfolgte wie unter (83) beschrieben. Die Einzelstrang-DNA, die bei der Sequenzierung als Template verwendet wird, wurde aus dem Kulturüberstand isoliert (84). Größtenmäßig nicht für die Ligierung in M13 Phagen geeignete Fragmente wurden analog zu oben in pUC Plasmid-

vektoren kloniert. Mit diesen Konstrukten transformiert wurden kompetente Zellen des E.coli Stammes 490A. Auf Ampicillin-Agarplatten (100 μ g/ml) wurden positive Klone herausselektioniert. Die Anzucht einzelner Kolonien erfolgte in LB^o-Medium (100 μ g Ampicillin/ml), bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde nach Birnboim-Doly (83) isoliert.

4.7. DNA-Sequenzierung

Mit Hilfe detaillierter Restriktionskartierung und Hybridisierungen mit subgruppenspezifischen Klonen wurden DNA-Bereiche, die sequenziert werden sollten, genau eingegrenzt. Geeignete Fragmente wurden in entsprechende M13 Vektoren (mp8-11;mp18;mp19) kloniert (4.7.). Sequenziert wurden diese nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger (84,85). Die Didesoxynukleotidkonzentrationen wurden so gewählt, daß spezifische Kettenabbrüche bis etwa 800 bp gegeben waren. Zur Auftrennung der mit ³²P bzw. ³⁵S -markierten Fragmentschar wurden 6%ige Acrylamidgele verwendet (86,87,88). Auf 40 cm langen Gelen (1.9 kV, Raumtemperatur) waren so Sequenzanalysen bis zu 700 bp Länge möglich. Dazu wurden drei unterschiedlich weit auflösende Elektrophoresen von jedem Klon durchgeführt. Erfolgte die Markierung mit ³⁵S, so wurden die Gele nach dem Lauf in einem wässrigen Gemisch aus 12% Methanol und 10% Essigsäure fixiert, anschließend 2-3 Stunden bei 80°C getrocknet und bei Raumtemperatur exponiert. Ansonsten wurden die Gele ohne Fixierung bei -70°C exponiert. Es wurden Fuji RX Röntgenfilme verwendet. (Die Sequenzierklone sind auf Seite 61 in Tabelle 3c aufgelistet).

4.8. Radioaktive Markierung von DNA

Für Hybridisierungen eingesetzte DNA wurde mittels DNaseI und DNA-PolymeraseI aus E.coli, unter Verwendung von α - 32 P-dATP und α - 32 P-dCTP radioaktiv markiert (89). Die Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide erfolgte durch Ausschluß-chromatographie über eine mit Sephadex G50 gefüllte "Mini-Säule". (Elutionspuffer: 10mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris pH 7,5).

4.9. DNA Transfer und Hybridisierungen

In Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente wurden durch alkalischen Transfer (90,91) auf Filter-Membranen (Gene-Screen oder Gene-Screen Plus; New England Nuclear, Boston) transferiert.

Die DNA wurde, um auch einen optimalen Transfer größerer DNA-Fragmente zu gewährleisten, einem Säureabbau unterzogen (0,25 N HCl, Farbumschlag des Bromphenolblaus im Gel diente als Zeitlimit). Die Fixierung der DNA auf dem Filter (Gene-Screen), erfolgte durch Backen im Vakuumofen bei 80°C für drei Stunden. Die Filter wurden nach Ref.92 mit radioaktiven Proben hybridisiert. Die Bedingungen der Vorhybridisierung waren: 0,5M Na-pyrophosphat, 7% SDS und 1 mM EDTA. Die Hybridisierung wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt. Das Waschen der Filter wurde in drei Schritten (1x30 min; 2x20 min) bei folgenden Bedingungen vorgenommen: 40mM Na-Pyrophosphat und 1% SDS (stringent) oder 200mM Na-Pyrophosphat und 1% SDS (nicht stringent).

Die Exposition erfolgte bei -70°C unter Verwendung von CAWO SE6 Verstärkerfolien und Fuji RX Röntgenfilmen. Bei Genbank- und Anreicherungsfiltern wurden der Hybridisierungslösung 0,1mg/ml Lachssperma DNA, 50 μ g/ml E.coli DNA und 750 μ l M13 DNA zugesetzt, um unerwünschte Hintergrundsignale zu unterdrücken.

4.10. Präparation von Anreicherungsfiltern

Hybridisierende Klone aus Genbankexperimenten wurden angereichert, indem Bakterienkolonien des entsprechenden Bereiches verdünnt und ausplattiert wurden. Nun erfolgte der Transfer auf Rundfilter (Colony/Plaque-Screen von New England Nuclear, Boston). Nach Ref.93 wurden Zell-Lyse und DNA-Denaturisierung durchgeführt und die DNA an die Filter gebunden. Anschließend wurden diese im Vakuumofen bei 80°C getrocknet.

4.11. Präparation von DNA

4.11.1. Isolierung von Cosmid und Plasmid-DNA

Die Anzucht der Cosmidklone erfolgte in LB°-Medium (10g/l NaCl, 10g/l Trypton, 5g/l Hefe-Extrakt), dem 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin zugegeben wurden bei 37°C über Nacht. Isoliert wurde die DNA durch alkalische Lyse (83), der sich bei Präparationen im Liter-Maßstab eine Reinigung über einen CsCl-Dichtegradienten anschloß (91). Mit einem CsCl gesättigtem n-Butanol-Isopropanol Gemisch (1:1) wurde das Ethidiumbromid entfernt. Die DNA-Lösung wurde nun mit TE auf das vierfache Volumen gebracht und danach eine Ethanol-fällung durchgeführt. DNA-Mengen wurden entweder photometrisch oder durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen auf Agarosegelen durchgeführt.

4.11.2. Isolierung von DNA aus M13 Phagenklonen

Doppelstrang-DNA aus M13 Phagenklonen wurde wie unter 4.12.1. beschrieben isoliert. Dazu wurden jeweils 5 ml einer Vorkultur mit dem entsprechenden M13 Phagen angeimpft und über Nacht bei 37 C inkubiert. Die Präparation von Einzelstrang-DNA aus dem Kulturüberstand erfolgte nach F.Sanger (84).

4.12. Biologische Sicherheit

Entsprechend den "Richtlinien" zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren" (5. überarbeitete Fassung des Bundesgesundheitsamtes, Mai 1986) wurden alle Klonierungsexperimente mit menschlicher DNA unter L2 Sicherheitsbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 3a: Übersicht über Subklone, die zur Charakterisierung von Cosmiden sowie zu Cosmidbankhybridisierungen eingesetzt wurden

Subklone	Zitate	Spezifität
m1-3	(53)	V _K I-Gensegment (Signalsequenz, Intron, codierende Region)
m1-8	Derivat von m1-3	V _K I-Gensegment (Intron und codierende Region)
m607-3	(21)	V _K II-Gensegment (codierende Region)
m41-7	(71)	V _K III-Gensegment (codierende Region)
m21-4	(40)	V _K III-Gensegment (Signalsequenz, Intron)
m21-1	(22)	L-Regionen, 3'-Flanke V _K II

Tabelle 3b: Übersicht über Subklone, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden und zur Charakterisierung von Cosmiden sowie zu Cosmid-bankhybridisierungen eingesetzt wurden

Subklone	Fragment	Vektor	Spezifität
m105-1	Sau3A-Fragment 400 bp (Abb.3)		L-Regionen, 3'- Flanke von L9
m127-2	Sau3A-Fragment 700 bp (Abb.3)	mp10 BamHI	L-Regionen, Zwischen- genbereich (Pos.33kb -34kb)
m127-3	Sau3A-Fragment 1,1 kb (Abb.3)	mp10 BamHI	L-Regionen, 5'- Flanke, V_{KI}
m19-3	Bam/Alu-Fragment 300 bp (Abb.3)	mp10 Bam/Sma	L-Regionen, 5'-Flan- ke V_{KI}
m1-9	Alu-Fragment 600 bp (Abb.12)	mp 10 SmaI	Phagenklon $\lambda 1$, Suchklon
m5-5	Sau3A-Fragment 1,1 kb (Abb.11)	mp 10 BamHI	Phagenklon $\lambda 5$, duplizierter Bereich von A30, 5'- und 3'- Seite der Lb-Region

Tabelle 3c: Subklone, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Sequenzierung von Genen konstruiert wurden.

Cosmid, Gen	Subklon	Restriktionsenden des Fragmentes		Fragment- größe (bp)	M13-Vektor, Spaltung
		5'	3'		
cos 142					
A5	m142-31	BamHI	EcoRI	400	mp10 (BamHI,EcoRI)
	m142-32	EcoRI	BamHI	400	mp11 (EcoRI,BamHI)
	m142-33	XbaI	HpaII	500	mp11 (XbaI,AccI)
	m142-34	HpaII	XbaI	500	mp10 (AccI,XbaI)
	m142-35	XbaI	EcoRI	600	mp10 (XbaI,EcoRI)
	m142-36	XbaI	PvuII	800	mp10 (XbaI,SmaI)
cos 163					
A23	m163-32	BamHI	PvuII	400	mp10 (BamHI,SmaI)
	m163-33	PvuII	BamHI	400	mp11 (SmaI,BamHI)
	m163-34	BglII	BamHI	1250	mp10 (BamHI)
	m163-35	BglII	PstI	400	mp11 (BamHI,PstI)
	m163-36	PstI	BglII	400	mp10 (PstI,BamHI)
cos 127					
L9	m127-1	PvuII	PvuII	700	mp10 (SmaI)
	m127-2	PvuII	PvuII	700	mp10 (SmaI)
cos 607/32					
L16	m607/32-1	PvuII	PvuII	700	mp10 (SmaI)
	m607/32-2	PvuII	PvuII	700	mp10 (SmaI)
cos 105					
L15	m106-15	PvuII	PvuII	1700	mp10 (SmaI)
	m106-16	PvuII	PvuII	1700	mp10 (SmaI)

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine der duplizierten Regionen des V_K -Locus untersucht. Ein Ziel der Arbeitsgruppe ist es, den menschlichen V_K -Locus in der Keimbahnkonfiguration zu kartieren. Dadurch lassen sich zum einen die Anzahl und die Lage der V_K -Gensegmente bestimmen. Dies ermöglicht exakte Aussagen über den Anteil der in der Keimbahn vorhandenen V_K -Gensegmente an der Entstehung der Vielfalt der Antikörper und läßt auch Rückschlüsse auf den Anteil somatischer Mutationen zu. Zum anderen erlauben die zusammenhängenden, klonierten Bereiche des V_K -Locus Aussagen über Entstehung und Veränderung von Multigenfamilien in der Evolution.

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bildeten die L-Regionen. Zunächst wurden Cosmide, die mit V_{KII} - und V_{KIII} -Proben isoliert worden waren, kartiert und den entsprechenden Abschnitten der L-Regionen zugeordnet. Dadurch konnten die L-Regionen sowohl an der 5'-Seite als auch an der 3'-Seite extendiert werden. Auf der 5'-Seite konnte ein Gen der Subgruppe III lokalisiert und charakterisiert werden. In einem weiteren Schritt wurden nun Suchklone konstruiert, die zum Absuchen von Cosmidbanken geeignet waren. Die Ausgangsfragmente dieser Suchklone stammten zumeist aus den weiteren Flankenbereichen von Genen. Dabei stellte sich heraus, daß die Flanken von Genen der gleichen Subgruppe eine starke Homologie zueinander aufweisen. Dieses Merkmal scheint für die L-Regionen charakteristisch zu sein. Des weiteren wurde ein Hybridisierungsklon konstruiert, der jeweils spezifisch nur ein Fragment aus einer der beiden L-Kopien erkennt. Derartige Klone sind zu Aussagen über die Gesamtstruktur des V_K -Locus mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese unerläßlich. Aufgrund der neu-konstruierten Suchklone konnten extendierende Cosmide der 3'-Seite der L-Regionen isoliert werden, die ein neues V_K -Gen der

Subgruppe I tragen. Neben dem Ansatz, die L-Regionen sukzessive, ausgehend von randständigen Suchklonen, zu extendieren und möglicherweise benachbarten Regionen anzuschließen, wurde ein weiterer Ansatz verfolgt. Zu Beginn dieser Arbeit wurden V_K -tragende λ -Phagen-Klone isoliert, die aber keinem der größeren zusammenhängenden Bereiche zugeordnet werden konnten. Zwei dieser λ -Klone zeigten ein besonderes Charakteristikum. Sie tragen in der nahen 3'-Flanke ihrer V_K I-Gene eine niedrig repetitive Sequenz. Von dieser Sequenzfamilie war gezeigt worden (39), daß sie sowohl mit als auch ohne V_K I-Gen in der Nachbarschaft im Genom existiert. Allerdings lagen bisher alle Klone, die mit Gen in der Nachbarschaft dieser Sequenzfamilie isoliert worden waren, innerhalb der L-Regionen. Dieses Indiz sprach für eine Lokalisierung der beiden λ -Klone in unmittelbarer Nähe der L-Regionen. Deshalb wurde versucht, diese beiden Klone den L-Regionen oder benachbarten Regionen anzugliedern, und zudem wurden Suchklone konstruiert, um Extensionen dieser λ -Klone zu ermöglichen. Der Phagenklon $\lambda 5$ konnte aufgrund von Spaltstellenähnlichkeiten sowie aufgrund von Sequenzanalysen eindeutig der Ab-Region zugeordnet werden. Die Ab-Region liegt in einem Abstand von ca. 40 kb auf der 5'-Seite der L-Regionen.

Sequenzanalysen des neu isolierten V_K III-Gens (L9) auf der 5' Seite der L-Regionen zeigten, daß es für einen der sogenannten "Rheumafaktoren" codiert. Diese lassen sich bei Rheumapatienten im Serum nachweisen. Von den fünf in dieser Arbeit sequenzierten V_K -Genen stellten sich zwei aufgrund zahlreicher Veränderungen im V_K -Bereich oder Veränderungen von Signalsequenzen als Pseudogene heraus. Überraschenderweise sind etwa die Hälfte der bisher sequenzierten, im Locus lokalisierten Gene Pseudogene. Diese sind damit dem Keimbahnpotential nicht völlig entzogen, da sie durch Punktmutationen oder Genkonversion möglicherweise wieder zu funktionellen Genen zurückmutieren können. Die neucharakterisierten Gene bestätigen, daß

die Gene nicht nach Subgruppen geordnet, sondern vielmehr in gemischter Reihenfolge im V_K -Locus vorliegen. Weiterhin konnte damit bestätigt werden, daß alle Gene einer Kopie in der gleichen Transkriptionsrichtung liegen.

Durch Sequenzanalysen von weiten 5'-Flanken der Gene L6, L6' und L16 konnte gezeigt werden, daß das Gen L6' ein Allel zu der La-Situation von L6 darstellt und nicht, wie früher vermutet, der Lb-Region zuzurechnen ist. Der Homologiegrad zwischen den Duplikaten der L-Regionen ist nicht gleichbleibend auf der Gesamtlänge der beiden L-Regionen. Es konnte mit Hilfe von Hybridisierungsversuchen gezeigt werden, daß auf der 3'-Seite eine sehr hohe Homologie zwischen den beiden Regionen besteht. Diese macht es bei den verwendeten Restriktionsenzymen unmöglich, in diesem Abschnitt zwischen den beiden Kopien Unterschiede in den Restriktionsschnittstellen zu finden. Auf den weiter 5' gelegenen Abschnitten lassen sich einige Unterschiede zwischen der La- und der Lb-Kopie feststellen, aufgrund derer die Duplikation gezeigt werden konnte. Im Bereich des Gens L15 bricht die Homologie zwischen den beiden Kopien jedoch plötzlich völlig ab. Durch Sequenzanalysen dieses Gens und Vergleiche mit dem Duplikat L5 konnte gezeigt werden, daß dieser Bruchpunkt im Intron des Gens L15 selbst liegt. Interessanterweise entspricht der 5'-Teil des Gens L15 aufgrund der Homologie eindeutig dem entsprechenden Teil des Duplikates L5, während der 3' vom Bruchpunkt gelegene Teil nicht mehr den für Duplikate geforderten Homologiegrad zu L5 aufweist. Aufgrund dieser Daten wird ein "ungleiches Cross-over" zwischen zwei V_K -Genen aus Vorläufern von Lb-Kopien postuliert.

6. Literaturverzeichnis

1. Honjo, T. und Habu, S. (1985) Ann. Rev. Biochem 54, 803-830
2. von Boehmer, H. (1988) Ann. Rev. Immunol. 6, 309-326
3. Kindred, B. (1978) Immunol. Rev 42, 60-75
4. Cooper, S., Klein, P.A. und Klein, J. (1978) J. Exp. Med. 147, 882-896
5. Zinkernagel, R.M. und Doherty, P.C. (1979) Adv. Immunol. 27, 51-177
6. Anderson, J. und Melchers, F. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2497-2501
7. Leibson, H., Marzack, P. und Kappler, J. (1981) J. Exp. Med. 154, 1681-1693
8. Martinez-Alonso, C. und Cautinho, A. (1981) Nature 290, 60-61
9. Zinkernagel, R.M. Callahan, G.N., Althage, A., Cooper, S., Streilein, J.W. und Klein, J. (1978) J. Exp. Med. 147, 897-911
10. Perlmann, P., Cerottini, J.-C. (1979) The Antigens, ed. M. Sela 5, 173-281
11. Gorczynski, R.M. und MacRae, S. (1979) J. Immunol. 122, 737-746
12. Hood, L.E., Weissman, I.L., Wood, W.B. und Wilson, J.H. (1984) Immunology, 2.Edition, Benjamin Cummings
13. Porter, R.R. (1959) Biochem. J. 73, 119-127
14. Hilschmann, N. und Craig, L.C. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 1403-1409
15. Tonegawa, S. (1983) Nature 302, 575-581
16. Williamson, A.R. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 467-500
17. Dreyer, W.J. und Benett, J.C. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 864-869

18. Hozumi, N. und Tonegawa, S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3628-3632
19. Lenhard-Schuller, R., Hohn, B., Brack, C., Hiramata, M. und Tonegawa, S. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4709-4713
20. Seidman, J.G. und Leder, P. (1978) Nature 276, 790-795
21. Klobeck, H.-G., Solomon, A. und Zachau, H.G. (1984) Nature 309, 73-76
22. Pech, M., Jaenichen, H.R., Pohlenz, H.-D., Neumaier, P.S., Klobeck, H.-G. und Zachau, H.G. (1984) J. Mol. Biol. 176, 189-204
23. Pech, M., Smola, H., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Gerl, R. und Zachau, H.G. (1985) J. Mol. Biol. 183, 291-299
24. Pohlenz, H.-D., Straubinger, B., Thiebe, R., Pech, M., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1987) J. Mol. Biol. 193, 241-253
25. Straubinger, B., Huber, E., Lorenz, W., Osterholzer, E., Pargent, W., Pech, M., Pohlenz, H.-D., Zimmer, F.-J. und Zachau, H.G. (1988) J. Mol. Biol. 199, 23-34
26. Max, E.E., Seidman, J.G. und Leder, P. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3450-3454
27. Sakano, H., Hüppi, H., Heinrich, G. und Tonegawa, S. (1979) Nature 280, 288-294
28. Pech, M., Höchtel, J., Schnell, H. und Zachau, H.G. (1981) Nature 291, 668-670
29. Baltimore, D., (1981) Cell 26, 295-296
30. Shimizu, A. und Honjo, T. (1984) Cell 36, 801-803
31. Milstein, C. (1967) Nature 216, 330-332
32. Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.H. und Gottesman, K.S. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest. U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda
33. Wang, A.C., Fudenberg, H.H., Wells, J.H. und Roelcke, D. (1973) Nature New Biology 243, 126-127

34. Weigert, M. und Riblet, R. (1976) Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 41, 837-846
35. Cory, S., Tylor, B.M. und Adams, J.M. (1981) J. Mol. Appl. Genet. 1, 103-116
36. Honjo, T., Packman, S., Swan, D. und Leder, P. (1976) Biochemistry 15, 2780-2785
37. Lorenz, W., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 9667-9676
38. Lötscher, E., Grzeschik, K.-H., Bauer, H.-G., Pohlenz, H.-D., Straubinger, B. und Zachau, H.G. (1986) Nature 320, 456-458
39. Straubinger, B., Pech, M., Mühlebach, K., Jaenichen, H.R., Bauer, H.-G. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 5265-5275
40. Pech, M. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 5249-5263
41. Bauer, H.-G. (1986) Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
42. Pohlenz, H.-D. (1986) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
43. Huber, C. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
44. Lautner, A. Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
45. Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1983) Cell 32, 181-189
46. Meindl, A. Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
47. Straubinger, B., Thiebe, R., Pech, M. und Zachau, H.G. (1988) Gene 69, 209-214
48. Lorenz, W. Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München
49. Chen, P.P. Dick, L.R., Frank, R.J., Thomas, J.K. und Carson, A.D. (1987) J. Exp. Med. 166, 1900-1905
50. Falkner, F.G. und Zachau, H.G. (1984) Nature 310, 71-74
51. Breathnach, R. und Chambon, P. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383

52. Akira, S., Okazaki, H. und Sakano, H. (1987) Science 238, 1134-1138
53. Jaenichen, H.-R., Pech, M., Lindenmaier, W., Wildgruber, N. und Zachau, H.G. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 5249-5263
54. Deev, S.D., Combriato, G., Klobeck, H.-G. und Zachau, H.G. (1986) Nucl. Acids Res. 15, 1-14
55. Bentley, D.L. und Rabbitts, T.H. (1980) Nature 288, 730-733
56. Smola, H. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität München
57. Aaiji, C. und Borst, P. (1972) Biochem. Biophys. Acta 269, 192-200
58. Cochet, M., Gannon, F., Hen, R., Maroteaux, L., Perrin, F. und Chambon, P. (1979) Nature 282, 567-574
59. Zimmer, F.-J. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
60. Klobeck, H.-G., Zimmer, F.-J., Combriato, G. und Zachau, H.G. (1987) Nucl. Acids Res. 15, 9655-9665
61. Epp, O., Lattmann, E.E., Schiffer, M., Huber, R. und Palm, W. (1975) Biochemistry 14, 4943-4952
62. Lötscher, E., Siwka, W., Zimmer, F.-J., Grummt, F. und Zachau, H.G. (1988) Gene 69, 225-236
63. Hohn, B. und Murray, M. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3259-3263
64. Collins, J. und Hohn, B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4242-4246
65. Hohn, B. und Collins, J. (1980) Gene 11, 291-298
66. Höchtel, J., Müller, C.R. und Zachau, H.G. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1383-1387
67. Lewis, S., Rosenberg, N., Alt, F. und Baltimore, D. (1982) Cell 30, 807-816
68. Lewis, S., Gifford, A. und Baltimore, D. (1984) Nature 302, 425-428
69. Lenhard-Schuller, R., Hohn, B., Brack, C., Hirama, M. und Tonegawa, S. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4709-4714

70. Weichhold, G. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
71. Klobeck, H.-G., Meindl, A., Combriato, G., Solomon, A. und Zachau, H.G. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 6499-6513
72. Messing, J. (1983) Methods in Enzymology Vol. 101, 20-78
73. Erbslöh, A. (1974) Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Freiburg
74. Straubinger, B. (1987) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München
75. Gafner, J., de Robertis, E.M. und Phillipsen, P. (1983) Embo J. 2, 583-591
76. Dugaiczyk, A., Boyer, H.W. und Goodman, H.M. (1975) J. Mol. Biol. 96, 171-184
77. Meinkoth, J. und Wahl, G. (1984) Analyt. Biochem. 138, 269-284
78. Norrander, J., Kempe, T. und Messing, J. (1983) Gene 26, 101-107
79. Vieira, J. und Messing, J. (1982) Gene 19, 259-268
80. Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. und Goodman, H.M. (1977) Science 196, 1313-1319
81. Maniatis, T., Hardison, R.G., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, D.K. und Efstratiadis, A. (1978) Cell 15, 687-705
82. Dagert, M. und Ehrlich, S. (1978) Gene 6, 23-28
83. Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) Nucl. Acids. Res. 7, 1513-1524
84. Sanger, F., Coulson, A.R., Barnell, B.G., Smith, A.J.K. und Roe, R.A. (1980) J. Mol Biol. 143, 161-178
85. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463-5467
86. Tabor, S. und Richardson, C.C. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci USA 84, 4767-4771
87. Bigin, U.D., Gibson, T.J. und Hong, G.F. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965

88. Ansorge, W. und Labeit, S. (1984) J. Biochem und Biophys. Method 10, 237-243
89. Rigby, P.W.J., Dieckmann, U., Rhodes, C. und Berg, P. (1977) J. Mol. Biol. 113, 237-251
90. Southern, E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98, 503-517
91. Reed, H.C. und Mann, D.A. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 7207-7221
92. Church, G.A. und Gilbert, W. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 1991-1995
93. Hanahan, D. und Meselson, M. (1983) Methods in Enzymology 100, 333-342
94. Tanaka, T. und Weißblum, B. (1975) J. Bacteriol. 121, 354-362

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
CDR	"complementarity determining region" hypervariable Abschnitte in den V-Regionen der leichten und schweren Ketten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FR	"Framework region" Regionen, die bei den variablen Anteilen von leichten und schweren Ketten die konstanten Bereiche bilden
J	"Joining segment" Gensegmente, die nach der Umlagerung von leichten Ketten die variablen Gensegmente mit den konstanten Gensegmenten verbinden
kb	Kilobasenpaare (1000bp)
L	"Leader-Sequenz", Signalpeptidbereich
L-Kette	Leichte Kette der Immunglobuline
Ref.	Referenz
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Na-Laurylsulfat)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Variable Region der Immunglobuline
V_K, V_λ	Gensegmente, welche die variablen Bereiche der leichten Ketten des κ - und λ - Typus codieren

Folgende Abkürzungen wurden in den Abbildungen für die eingesetzten Restriktionsnucleasen verwendet:

Ac=AccI, Ap=ApaI, Bm=BamHI, Bg=BgIII, Cl=ClaI, Dr=DraI, Ec=EcoRI, Ha=HpaII, HII=HindII, HIII=HindIII, Hp=HpaI, Kp=KpnI, Nr=NruI, PII=PvuII, Ps=PstI, Pv=PvuI, Rs=RsaI, SII=SacII, Sc=SacI, Sl=Sal, Su=Sau3A, Sm=SmaI, Sp=SphI, Tq=TaqI, Xb=XbaI, Xh=XhoI

Subklone sind mit Kleinbuchstaben und Zahlen gekennzeichnet. Dabei wird der verwendete Vektor durch den Buchstaben (p=Plasmid, m=M13) gekennzeichnet. Die Zahl gibt das Cosmid an, aus dem der Subklon stammt. Verschiedene Subklone aus dem gleichen Cosmid haben fortlaufende Nummern.

Lebenslauf

Ich wurde am 23.10.1959 in Stuttgart (Baden-Württemberg) geboren. Von 1966-1970. besuchte ich die Volksschule in Kornwestheim, dann das Gymnasium in Kornwestheim, wo ich 1979 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1979 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Biologie. Nach der Diplomprüfung im Dezember 1984 fertigte ich in Tübingen am Institut für Biologie I unter der Anleitung von Prof. Dr. Oberwinkler die Diplomarbeit an. Diese hatte den Titel "Klonierung und Kartierung von angrenzenden und überlappenden Restriktionsfragmenten der mitochondrialen DNA aus *Oenothera berteriana*". Seit Mai 1984 arbeitete ich am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter Anleitung von Prof. H. G. Zachau an der vorliegenden Arbeit.

